



Università di Pisa

*Dipartimento di Farmacia*

Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Effetto di diversi metodi di sterilizzazione del  
confezionamento primario sulla stabilità di Ketoftil®

*Relatore:*

Dott.ssa Ylenia Zambito

*Relatore:*

Dott. Marco Sansò

*Candidato:*

Battini Rebecca

Anno Accademico: 2013/2014

<b>Capitolo 1</b>	<b>4</b>
<b>Introduzione</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Colliri e loro impieghi nel trattamento della congiuntivite allergica</b>	<b>4</b>
1.1.1 La SAC	5
<b>1.2 Caratteristiche del Farmaco Ketofitil®</b>	<b>6</b>
1.2.1 Proprietà di Ketotifene fumarato: principio attivo	6
1.2.2 TS-polisaccaride: eccipiente	9
<b>1.3 Confezionamento primario</b>	<b>11</b>
1.3.1 il sistema innovativo Novelia®	12
1.3.2 Sterilizzazione del dispositivo Novelia®	16
<b>1.4 La Sterilizzazione</b>	<b>17</b>
1.4.1 Metodi di sterilizzazione fisici	17
1.4.2 Metodi di sterilizzazione chimici	18
1.4.3 Cinetica dell'inattivazione microbica	19
1.4.4 metodi di sterilizzazione analizzati	21
<b>1.5 Saggi di stabilità</b>	<b>31</b>
<b>Capitolo 2</b>	<b>33</b>
<b>Introduzione alla parte sperimentale</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Materiali e Metodi</b>	<b>35</b>
2.1.1 Metodi di sterilizzazione	35
2.1.2 Prove di stabilità dei colliri	36
2.1.3 Determinazione della concentrazione del Ketotifene Fumarato.	36
2.1.4 Determinazione dell'osmolarità dei colliri	38
2.1.5 Determinazione della viscosità dei colliri	39
<b>2.2 Risultati e discussione</b>	<b>40</b>
2.2.1 Separazione impurezze	40

2.2.2 Determinazione concentrazione Ketotifene Fumarato	40
2.2.3 Determinazione del pH del collirio	41
2.2.4 Determinazione dell'osmolarità del collirio	41
2.2.5 Determinazione viscosità colliri Ketoftil®	42
2.2.6 Determinazione stabilità con ossido di etilene	42
<b>Capitolo 3</b>	<b>43</b>
<b>Conclusioni</b>	<b>43</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>45</b>
<b>Figure</b>	<b>47</b>

*Alla mia famiglia.*

*A coloro che ogni giorno mi rendono felice.*

# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Colliri e loro impieghi nel trattamento della congiuntivite allergica

Con il termine collirio è indicata qualsiasi preparazione medicamentosa ad uso topico oculare, destinata quindi ad essere applicata sulla mucosa congiuntivale. I colliri possono essere sia liquidi (soluzioni acquose, gel a bassa viscosità, soluzioni oleose o sospensioni) che solidi (pomate, unguenti, gel ad alta viscosità o polveri).

Le caratteristiche fondamentali che deve avere una preparazione oftalmica sono:

- pH generalmente compreso tra 6.4 e 7.8
- sterilità ed assenza di particelle estranee
- pressione osmotica isotonica con le lacrime; osmolarità molto basse (inferiori a 150 mOsm/kg) o molto alte (superiori a 340 mOsm/kg) possono dimostrarsi irritanti per l'epitelio corneale.

Attualmente le industrie farmaceutiche tendono a focalizzarsi su due tipi di colliri diversi:

- colliri intesi come farmaci, contenenti quindi principi attivi,
- colliri medical devices senza principi attivi.

I primi sono rappresentati da colliri utilizzati nel trattamento delle patologie oculari, come il glaucoma in cui si evidenzia un aumento della pressione endoculare e in cui sono diversi i principi attivi impiegati dai beta bloccanti alle prostaglandine, infezioni oculari in cui si impiegano antibatterici, congiuntiviti allergiche in cui s'impiegano colliri antistaminici per il trattamento dei sintomi.

I colliri medical devices sono invece soluzioni idro-saline ad attività emolliente, rinfrescante o lubrificante, prive di principi attivi, utilizzati prevalentemente nella sindrome dell'occhio secco, in cui le sostanze contenute hanno un'azione meccanica e non farmacologica.

### 1.1.1 La SAC

La congiuntivite allergica stagionale (SAC), o febbre da fieno, è una reazione di ipersensibilità a specifici allergeni presenti nell'aria (principalmente pollini). Con una stima di prevalenza di circa il 15-20 % la SAC è la più comune forma di allergia oculare, che colpisce allo stesso modo adulti e bambini. Questa immunopatologia provoca nell'epitelio corneale una iperplasticità e presenza di infiltrato di mastociti, eosinofili, cellule del Langherans e linfociti T CD4+.

Sebbene gravi conseguenze a livello della cornea sono rare, i segni e sintomi angoscianti della SAC possono causare disagio estremo. I sintomi variano da prurito, arrossamento al rigonfiamento e alla lacrimazione eccessiva. La risposta allergica risulta innescata dal legame dell'allergene alle immunoglobuline (IgE), situate sulla superficie dei mastociti congiuntivali grazie al legame che contraggono con il recettore; questo porta alla degranulazione dei mastociti e al rilascio di mediatori, tra cui istamina, eparina, triptasi, leucotrieni, citochine e il fattore attivante le piastrine. L'istamina stimola le terminazioni nervose e dilata i vasi sanguigni causando prurito e arrossamento. Analogamente il fattore di attivazione piastrinica dilata i vasi sanguigni e recluta eosinofili al sito dell'infiammazione, con conseguente arrossamento e gonfiore e una reazione allergica prolungata. Visto che riuscire ad evitare gli allergeni è impossibile vi è spesso la necessità di interventi terapeutici che offrono un efficace sollievo dei sintomi.

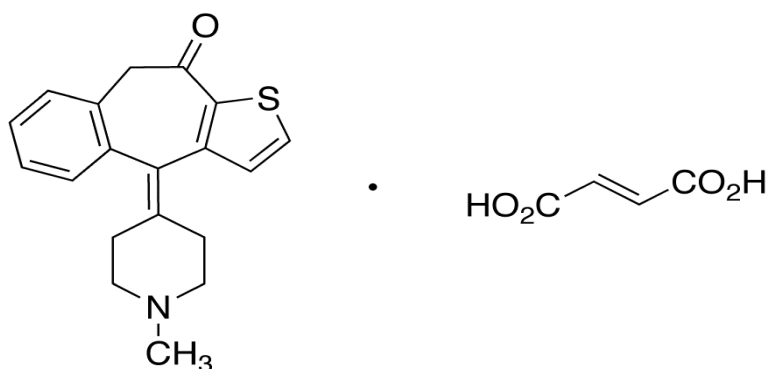
La terapia della SAC è oggi affrontata con diversi colliri in cui i principi attivi più impiegati sono: Azelastina, Sodio Cromoglicato, Levocabastina, Olopatadina e Ketotifene Fumarato.

In particolare gli ultimi due sono i più impiegati e Farmigea, azienda oftalmica italiana, è Leader nel mercato nazionale con un formulato a base di Ketotifene.

## 1.2 Caratteristiche del Farmaco Ketofil®

### 1.2.1 Proprietà di Ketotifene fumarato: principio attivo

Il Ketotifene fumarato o idrogeno fumarato ( $C_{23}H_{23}NO_5S$ ) nome commerciale del 4,9-diidro-4-(1-metil-4-piperidiniliden)-10H-benzo[4,5]cicloeppta[1,2-b]tiofen-10-one (2E)-2-butenedioate è un cicloeptatofene, preparato sinteticamente, con proprietà sia antistaminiche che antiallergiche. Simile nella sua attività farmacologica al Cromoglicato sodico, inibisce la degranulazione dei mastociti e degli eosinofili impedendo il rilascio di mediatori infiammatori, inoltre provoca il blocco dei recettori dell'istamina H-1, per questo viene utilizzato nella gestione dell'asma (non attacchi acuti) o per il trattamento di condizioni allergiche tra cui rinite e congiuntivite.



**Fig. 1** Struttura del Ketotifene fumarato.

#### *-Farmacocinetica*

Il Ketotifene fumarato è quasi completamente assorbito dopo somministrazione orale (emivita assorbimento < 1 ora), anche se la biodisponibilità è solo circa il 50 % a causa del metabolismo epatico di primo passaggio. Per Somministrazione oculare (coniglio) il ketotifene fumarato marcato con C14, mostra una massima concentrazione nei tessuti oculari dopo 15 minuti dalla somministrazione; il livello massimo si raggiunge nell'epitelio corneale, seguito da congiuntiva, cornea, iride, sclera, corpo ciliare e umore acqueo.

Per quanto riguarda l'eliminazione il Ketotifene viene escreto principalmente sotto forma di vari metaboliti inattivi nelle urine (25-30%) , il resto attraverso la bile viene espulso con le feci e, anche se in piccola parte, possiamo trovare il Ketotifene anche nel latte materno. Il tempo di ritenzione medio a livello congiuntivale è di 5,7 ore. La concentrazione ematica per dosi oculari ripetute è stata calcolata essere pari a circa 1/70 di quella congiuntivale.

I metaboliti principali comprendono:

- *norketotifene* (prodotto demetilato con attività farmacologica simile a ketotifene),
- *10 -idrossiketotifene*
- *Ketotifene N-glucuronide*, prontamente idrolizzato di nuovo al composto progenitore.

#### *-Target farmacodinamico*

Il Ketotifene fumarato ha tre meccanismi farmacologici indipendenti che sembrano contribuire ai suoi effetti anti-allergici:

##### *1) inibizione dei recettori dell'Istamina H1:*

Il recettore H1-istaminergico accoppiato a proteine Gq, tramite l'attivazione della fosfolipasi C, provoca l'aumento del calcio intracellulare. La sua attivazione da parte dell'istamina o di sostanze Istamino-mimetiche determina una vasodilatazione pur essendoci un aumento del calcio intracellulare, in quanto questi recettori sono localizzati a livello delle cellule endoteliali. L'istamina provocando infatti l'aumento del calcio, va ad attivare la nitrossido-sintasi con la formazione del nitrossido (NO) che funziona da mediatore perché diffonde nello strato muscolare ove attiva la guanilato-ciclasa (ha un gruppo eme nella sua struttura che riceve il NO) con formazione di cGMP. Questo provoca l'attivazione di proteine (PKG) che defosforilano e disattivano la miosina, proteina responsabile della contrazione della cellula muscolare, determinando miorilassamento. Inoltre le PKG vanno a fosforilare i recettori dell'IP3(Inositolo trifosfato) situati sulla superficie del reticolo sarcoplasmatico delle cellule muscolari lisce e sul reticolo endoplasmatico delle cellule endoteliali, impedendone l'aggancio con l'IP3 stesso e inibendo il rilascio del calcio dall'SR o dall'ER, bloccando così la contrazione della muscolatura liscia e inducendone quindi il rilassamento.

Oltre che sulle cellule endoteliali che rivestono i vasi di piccolo calibro, questi recettori si trovano nell'intestino, bronchi, sistema cardiovascolare, sistema nervoso centrale (a localizzazione postsinaptica).

Gli effetti principali del Recettore H1 sono la contrazione della muscolatura liscia bronchiale, la vasodilatazione, l'aumento della permeabilità capillare (secondario alla contrazione delle cellule endoteliali e alla formazione di fessure intercellulari che



consentono il passaggio di liquido e proteine plasmatiche negli spazi interstiziali), il mantenimento dello stato di veglia e la stimolazione dei centri del vomito.

## *2) stabilizzazione dei mastociti e degli altri elementi cellulari (basofili, eosinofili, neutrofili).*

Le cellule che secernono istamina in seguito ad uno stimolo nocivo sono i mastociti.

In queste cellule l'istamina insieme ad altre molecole è contenuta in granuli che vengono prontamente liberati dai mastociti al momento del bisogno.

Il Ketotifene altera la permeabilità delle membrane cellulari agli ioni calcio con inibizione del flusso intracellulare di calcio e conseguente blocco della degranulazione. Quest'effetto blocca la manifestazione allergica nella sua fase iniziale grazie all'inibizione del rilascio dei mediatori chimici precedentemente elencati.

## *3) prevenzione dell'accumulo di eosinofili e inibizione della degranulazione.*

Questo a sua volta determina il blocco della liberazione di enzimi (idrolasi lisosomiali, perossidasi), proteine basiche, mediatori lipidici, citochine, chemochine (Jewell et al., 2007).

Molti studi scientifici degli ultimi anni hanno testato l'efficacia del Ketotifene rispetto ad altri principi attivi, questo è ben evidente anche nella tabella 1, dove il confronto con Levocabastina, uno dei principali antagonisti dei recettori istaminici H1, permette di osservare la maggior efficacia del Ketotifene sui più importanti sintomi che la SAC provoca (Kidd et al., 2003).

**Table 5** Mean ocular signs and symptoms scores in the intent to treat population at day 5–8 visit

Signs and symptoms	Mean score*			p Value†	
	Ketotifen (n = 163)	Placebo (n = 163)	Levocabastine (n = 166)	Ketotifen v placebo	Ketotifen v levocabastine
Redness	0.80	0.93	0.92	0.03	0.04
Itching	1.29	1.37	1.43	0.57	0.26
Tearing	0.64	0.84	0.89	0.02	0.02
Chemosis	0.26	0.34	0.30	0.10	0.32
Lid swelling	0.40	0.51	0.45	0.22	0.84
Discharge	0.16	0.23	0.20	0.11	0.20
Composite score	3.54	4.15	4.18	0.03	0.03

\*Higher scores indicate more severe symptoms. †p values not corrected for multiple analyses.

**Tab. 1** Punteggi medi di segni e sintomi. Da Kidd et al. (2003)

La maggior parte di colliri antistaminici in commercio con principio attivo Ketotifene fumarato presentano una concentrazione del p.a. pari al 0,025%. In Ketoftil® (Farmigea) invece la concentrazione è pari al doppio, i motivi principali che hanno portato allo sviluppo di una forma farmaceutica con tale concentrazione sono dovuti ad uno studio effettuato su pazienti con congiuntivite allergica e primaverile che ha permesso di riscontrare un miglioramento dei sintomi nell'85% nei pazienti trattati con Ketotifene fumarato 0.05%, mentre solo il 23% dei pazienti trattati con Ketotifene fumarato 0.025% avevano mostrato miglioramenti (Bux et al., 2003)

### 1.2.2 TS-polisaccaride: eccipiente

Il TS-polisaccaride è una frazione polisaccaridica purificata, neutra, idrosolubile, ad alto peso molecolare (circa 600KDa) ottenuta dall'endosperma dei semi di *tamarindus indica*. Si tratta di una molecola polimerica di galattosiloglucano molto idrofila con struttura ramificata:

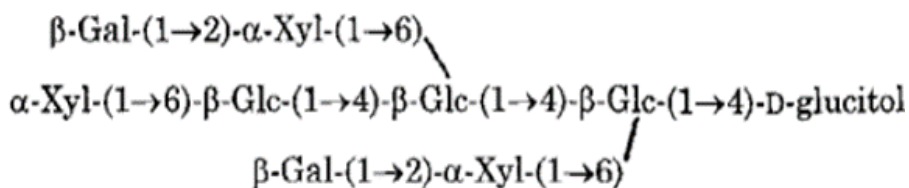


Fig. 2 Struttura chimica del TS polisaccaride

Questa configurazione è molto simile a quelle delle mucine, in particolar modo quella della MUC-1 (mucina presente nell'epitelio congiuntivale e lacrimale) che gli conferisce ottime proprietà mucoadesive e permette la formazione di legami di varia natura con le mucine stesse. Sempre grazie alla ramificazione e all'assenza di carica elettrica il TS-P favorisce l'adesione alla membrana delle cellule epiteliali apicali, congiuntivali e corneali, e l'ancoraggio delle cellule basali alla matrice extracellulare.

Oltre alla mucoadesività, ha altre caratteristiche come la non cancerogenicità, la biocompatibilità, l'alta capacità di legare il farmaco, una elevata stabilità ad alta pressione ed il vantaggio di non indurre modificazioni clinicamente significative dei segni vitali (pressione sanguigna, frequenza cardiaca, temperatura corporea).

TS-polisaccaride (TS-P) presenta comunque due svantaggi:

- subisce degradazione con la formazione di derivati a basso peso molecolare, oligosaccaridi e monosaccaridi ma solo in condizioni estreme di pH e temperatura.
- subisce degradazione in presenza di radicali, possibile conseguenza osservabile a causa della sterilizzazione del confezionamento primario con radiazioni ionizzanti (Di Colo et al., 2009).

### 1.2.3 Benzalconio cloruro: Conservante

Per garantire l'asetticità nelle preparazioni oftalmiche contenute in flaconi destinati ad essere aperti e richiusi più volte, alle preparazioni viene di solito aggiunto Benzalconio cloruro. Il suo impiego in oftalmologia è stato favorito dalla sua inerzia nei confronti dei materiali plastici di cui sono composti molti flaconi di colliri. E' un detergente cationico: questa proprietà lo fa rapidamente legare a superfici con carica negativa (proteine, batteri, ecc., ma anche la cornea). La sua elevata attività detergente induce una denaturazione delle proteine con cui viene a contatto e provoca modificazioni enzimatiche irreversibili a carico delle membrane cellulari. Il meccanismo d'azione antibatterico è legato alla sua capacità di alterare la membrana cellulare dei batteri modificandone la permeabilità, con perdita di enzimi, coenzimi e conseguente inattivazione del microrganismo.

L'azione del Benzalconio cloruro non si esplica solo a livello batterico ma anche a livello delle cellule di rivestimento della superficie oculare, per questo nelle terapie a lungo termine esso agisce negativamente sulla superficie oculare causando alterazioni dell'architettura biochimica del film lacrimale (occhio secco) e danneggiando la membrana cellulare degli epitelio corneali e congiuntivali. In particolar modo il Benzalconio cloruro riduce il numero di cellule produttrici di muco ed a causa della loro carica negativa a pH fisiologico interagisce con le mucine, che hanno un'azione indispensabile per proteggere e mantenere la funzionalità della superficie oculare.

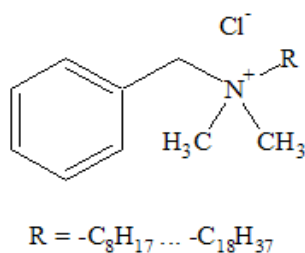


Fig. 3 Struttura chimica del Benzalconio cloruro

### 1.3 Confezionamento primario

Il confezionamento primario ha lo scopo di preservare la sterilità del collirio multidose senza aggiunta di conservanti. Al fine di sviluppare un contagocce che rispetti questo obiettivo sono necessarie due funzioni:

- erogazione delle gocce, pur mantenendo la sterilità
- consentire l'ingresso di aria all'interno del contenitore per compensare il volume erogato, assicurando anche in questo caso il mantenimento della sterilità.

I principali tipi di confezionamento primario che troviamo oggi sul mercato per colliri multidose senza conservanti consentono di preservare la sterilità del prodotto grazie all'impiego di filtri particolari. I filtri sono infatti una soluzione comune per creare una barriera contro la potenziale contaminazione.

Qui di seguito sono illustrati i principali confezionamenti primari ancora oggi in commercio.

FLACONCINO ABAK<sup>®</sup> SYSTEM DI THEA: è stato il primo flaconcino multidose senza conservante, che permette di garantire la sterilità del suo contenuto per due mesi dopo la prima apertura e di evitare i numerosi danni oculari dovuti all'uso di conservanti. La parte innovativa è dovuta alla presenza di un filtro utilizzato per consentire il passaggio di un liquido (filtro idrofilo) ed uno per consentire il flusso dell'aria all'interno del dispositivo (filtro idrofobo). Questi filtri hanno una porosità di 0.2µm adatta a bloccare i batteri in ingresso. Facile da usare, economico (1flacone=150mondose) ABAK<sup>®</sup> SYSTEM è ancora oggi uno dei confezionamenti più utilizzati.

FLACONCINO COMOD<sup>®</sup> SYSTEM: altro confezionamento capace di garantire la stabilità del prodotto privo di conservanti fino a 12 settimane dopo l'apertura. In questo caso non viene usato un filtro idrofilo ma un sistema di valvola unidirezionale compatibile con una viscosità fino a 1000 mPas.

COMOD<sup>®</sup> è l'acronimo di “continuous monodose”: la descrizione di un sistema di applicazione a spruzzo integrato che consente l'erogazione di dosi multiple sterili di medicinali o cosmetici liquidi. Premendo la pompa, un condotto di ventilazione sofisticata impedisce che la soluzione nel flacone venga a contatto con l'aria dell'ambiente potenzialmente contaminata. Gli elementi centrali di questo sistema sono la pompa ed il flacone. Quest'ultimo contiene una sacca flessibile con la soluzione all'interno e dopo

l'applicazione di una goccia, la differenza di pressione è equilibrata dal flusso d'aria non nel contenitore della soluzione ma nello spazio tra la parete esterna della bottiglia e il sacchetto contenitore flessibile più interno.

La caratteristica più importante di questo dispositivo è la presenza di una spirale di acciaio e placcata in argento che si trova nella zona superiore del capillare dove si ha la fuoriuscita del liquido. Tale spirale grazie al rilascio di ioni e complessi argento esercita un'azione antimicrobica all'interno del capillare stesso (Teping et al., 1994).

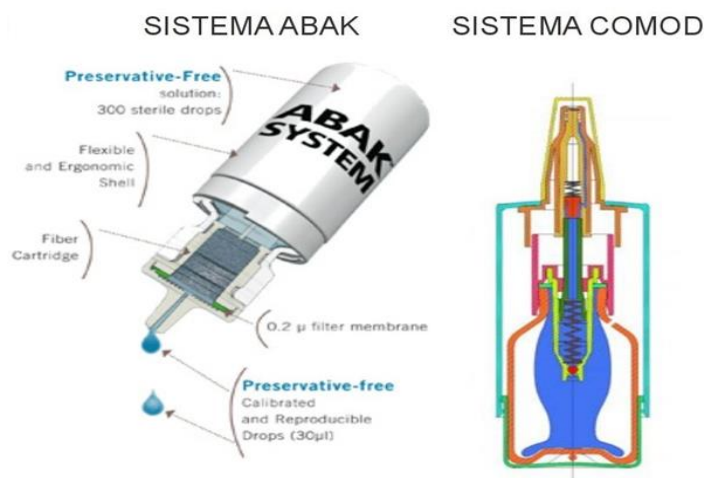


Fig. 4 Alcuni esempi di flaconi multidose per colliri

### 1.3.1 Il sistema innovativo Novelia®

Questo flacone permette di gestire una vasta gamma di prodotti con viscosità variabile mantenendo il contenuto sterile durante la durata del trattamento.

Il dispositivo è passato attraverso un programma ricco di "challenge test" e per dimostrare la sua funzionalità sono stati effettuati test su 100 pazienti negli Stati Uniti e in Europa.

Farmigea ha già messo in commercio uno dei suoi principali prodotti "Xiloial zero" proprio con questo flacone che permette una conservazione del prodotto privo di conservante fino a 90 giorni dopo l'apertura.

Tale flacone non presenta nessun filtro ma ha un tappo di silicone che non presenta possibilità di dispersione del contenuto nel tappo quando chiuso e presenta una valvola

flessibile per una fuoriuscita più semplice delle singole gocce. Questo prodotto è stato eletto il miglior contagocce multidose senza conservanti in quanto presenta numerosi vantaggi:

- facile da usare e sempre a portata di mano
- grande precisione per il bersaglio oculare
- utilizzabile con soluzioni e sospensioni con viscosità superiore a 1000 mPas
- design compatto e attraente
- vantaggioso economicamente, il quantitativo di plastica utilizzata è ridotto rispetto ad un monodose

I "performance test" hanno evidenziato un volume delle gocce prodotte di 40 µl mentre la velocità di erogazione è compresa tra 1 e 4 sec.

#### *-Struttura e funzionamento:*

Rexam Healthcare ha sviluppato un innovativo sistema di ventilazione che permette la fuoriuscita del prodotto senza contaminazione microbica.

I vantaggi principali di questo sistema sono:

- l'integrità del sistema
- nessun intasamento del sistema di ventilazione
- il sistema di ventilazione funziona bene con la maggior parte dei liquidi viscosi compresi le sospensioni

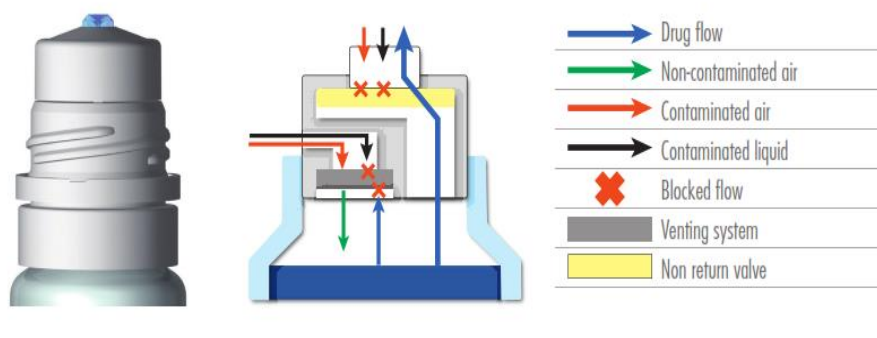


Fig. 5 Il sistema Novelia ®

Come evidenziato nella figura6 durante la compressione del flacone la soluzione passa attraverso un condotto in silicone andando così a raggiungere la valvola anch'essa in silicone. La forma del condotto attraverso il quale passa il prodotto è diversa a seconda della sua viscosità in quanto il condotto per un prodotto con viscosità elevata è disposto in senso verticale e quindi parallelo al flusso del prodotto, mentre i liquidi meno viscosi percorrono condotto circolare. Dalla parte opposta alla fuoriuscita del liquido dal condotto si trova un foro che permette l'entrata dell'aria, che attraverso un piccolo tubicino viene convogliata nella parte centrale del sistema senza venire a contatto con il condotto dove passa il collirio. In questo modo l'aria viene filtrata, decontaminata e finisce nel flacone per andare a riequilibrare la pressione interna ed evitare la compressione del device.

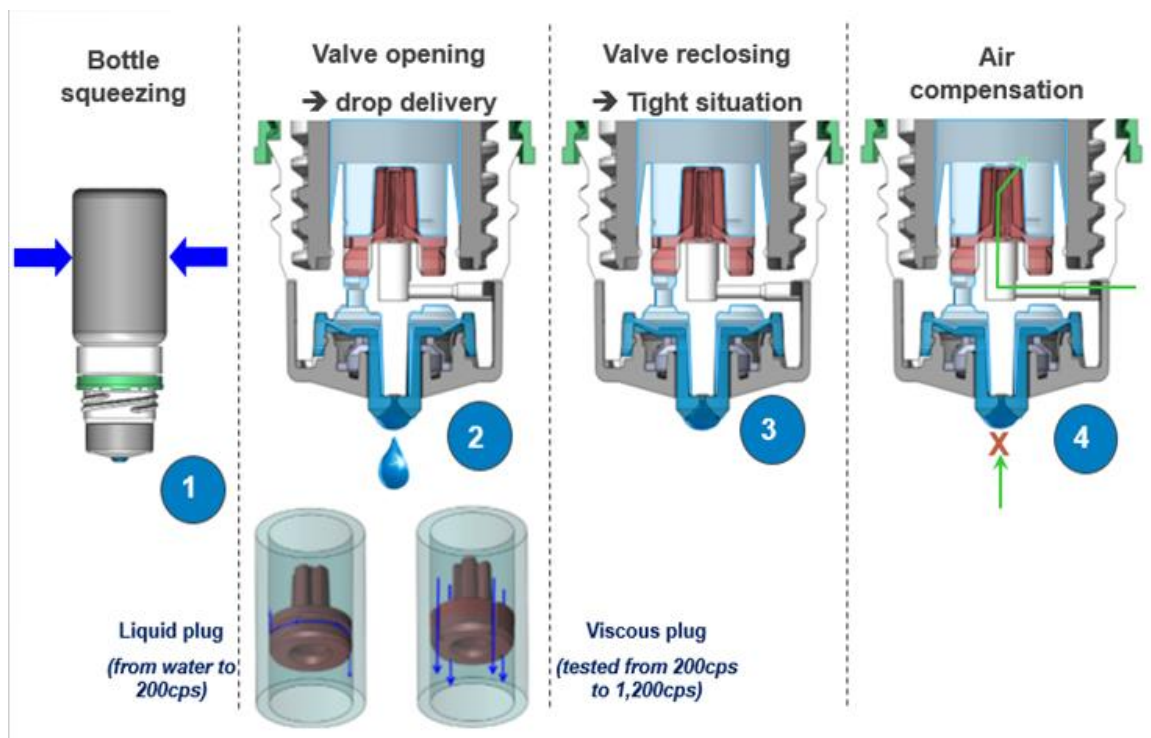


Fig. 6 schema di funzionamento di Novelia®

### *-efficacia antimicrobica*

L'efficacia delle prestazioni senza conservanti di Novelia® è stata pienamente dimostrata:

Dal novembre 2009 sono stati testati 4.800 prodotti, questo significa 155.000 gocce erogate. Queste prove sono state condotte da tre diversi laboratori di analisi con il supporto di esperti in batteriologia per costruire dei protocolli di test.

Questi protocolli microbiologici sono stati costruiti basandosi sull'uso del dispositivo da parte dei pazienti. Sono stati necessari tre approcci per ottenere una piena comprensione delle prestazioni di Novelia®:

1. uso normale da parte del paziente
2. uso improprio da parte del paziente
3. condizioni di contaminazione estremamente elevate

Da mettere in evidenza che i test di contaminazione microbica variavano in base alla viscosità e al tipo di formulazione. Tutti i test eseguiti hanno fornito ottimi risultati, dimostrando così che Novelia® può mantenere il contenuto sterile anche in condizioni estreme di contaminazione.

### *-importanza del design*

Nel luglio 2011, è stato condotto uno studio con lo scopo di verificare che il design di Novelia® fosse attraente per i consumatori ed ergonomicamente ottimo.

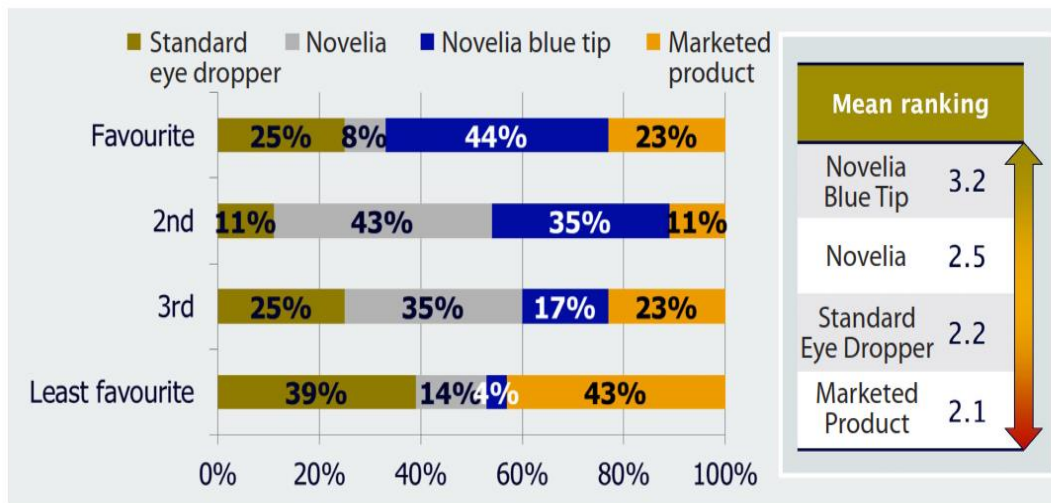
Sono stati intervistati 100 pazienti consumatori del contagocce:

- 50% in Europa e 50% negli USA
- 50% compresi tra 41 e 60 anni e 50% anziani (oltre 61 anni)
- tutti i pazienti osservavano trattamenti oculari cronici

Le versioni di Novelia® analizzate erano due: tappo bianco e punta colorata e tappo completamente bianco che sono state confrontate con un prodotto multidose senza conservanti già in commercio.

Nella tabella 2 sono riportati i risultati di questi test, dove si vede che il prodotto Novelia® con tappo bianco e punta blu era significativamente più gradito dai pazienti.





**Tab. 2** Sondaggio sul confezionamento primario favorito dai consumatori

### 1.3.2 Sterilizzazione del dispositivo Novelia®

Il trattamento fondamentale per mantenere una sterilizzazione del prodotto così a lungo è il processo di sterilizzazione del confezionamento primario. In questo caso è stato utilizzato un processo di sterilizzazione a secco con radiazioni gamma sull'intero dispositivo.

La dose di irradiazione certificata ed utilizzata è compresa tra 25 Kgy e 50 Kgy. Si tratta di una dose estremamente elevata che aveva il duplice obiettivo di sterilizzare il prodotto e di conferire alle plastiche utilizzate le giuste caratteristiche di elasticità e resistenza richieste.

Le materie prime che compongono infatti il dispositivo Novelia® sono HDPE, polietilene ad alta densità, principale componente sia del tappo che dell'ugello e LDPE, polietilene a bassa densità, costituente principale del flacone. In entrambi i casi è stata dimostrato un eccellente processo di reticolazione delle plastiche durante la sterilizzazione con raggi gamma, che porta i copolimeri del PE ad essere utilizzati con sicurezza nei dispositivi medici e nei confezionamenti dei device. Lo stesso comportamento vantaggioso è stato osservato anche per le gomme siliconiche di cui sono composte le due strutture fondamentali del dispositivo Novelia® ovvero il condotto e la valvola, mostrando così una elevata tolleranza alle radiazioni del processo sterilizzante. (Berejka et al., 2008)

## 1.4 La Sterilizzazione

La sterilità è un requisito fondamentale soprattutto per preparati oftalmici e iniettabili, da non confondere con l'asetticità che invece richiedono gli ambienti dove queste formulazioni vengono preparate.

Mentre la sterilizzazione consiste nella distruzione della carica microbica all'interno della formulazione farmaceutica, nonostante sia impossibile verificare che questa inattivazione sia effettivamente avvenuta, l'asetticità consiste nel mantenimento di un grado di contaminazione controllato e così basso che la contaminazione di un materiale presente in quell'ambiente è un evento con probabilità molto bassa.

La norma UNI EN556-1:2002 riporta condizioni di riferimento per ciascun metodo di sterilizzazione e considera sterile un lotto di unità di dosaggio quando esiste un solo microrganismo vitale in 1.000.000 unità di dosaggio (SAL  $10^{-6}$ ).

I metodi di sterilizzazione si dividono in:

- fisici
- chimici

### 1.4.1 Metodi di sterilizzazione fisici

#### *Sterilizzazione con calore*

Uno dei metodi più comuni per l'uccisione dei microrganismi è l'utilizzo del calore che distrugge le cellule viventi attraverso la coagulazione delle proteine. Si effettua direttamente sulla preparazione già confezionata nel suo recipiente definitivo che essendo sigillato non permetterà nessuna contaminazione fino all'apertura del contenitore.

Sono applicate due tecniche di sterilizzazione per mezzo del calore:

*calore secco*: consiste in un trattamento in stufa a circa 180 °C su materiali con una elevata resistenza termica, quindi principalmente vetreria ed oggetti metallici. L'equilibrio termico del materiale da sterilizzare viene raggiunto dopo un certo tempo visto che l'aria all'interno della stufa presenta una bassa conducibilità termica. Per ridurre tale problema e facilitare la circolazione dell'aria vengono utilizzati sistemi di ventilazione ad aria forzata. Non utilizzabile per preparazioni oftalmiche.

*calore umido*: si utilizza vapore acqueo all'interno di una autoclave. Il vapore presenta una elevata capacità di permeazione attraverso corpi porosi e fibre tessili ed un'alta capacità termica.

### **Sterilizzazione per filtrazione**

Ha lo scopo di rimuovere fisicamente i microrganismi. Viene applicata a tutti i sistemi liquidi e gassosi, in particolare alle sostanze termolabili. Questo metodo si avvale dell'utilizzo di filtri costituiti da materiale poroso attraverso il quale viene fatta passare la soluzione da sterilizzare; per essere efficace il filtro dovrà possedere un diametro dei pori tale da permettere il passaggio dei componenti della soluzione, ma trattenere i componenti non desiderati. La scelta del filtro deve essere effettuata in relazione alle dimensioni del microrganismo da eliminare, le cellule batteriche più grandi ad esempio possono avere diametro superiore al 10  $\mu\text{m}$  mentre le dimensioni di alcuni batteri possono essere inferiori a 0,3  $\mu\text{m}$ . I filtri vengono utilizzati frequentemente anche in virologia pertanto dovranno possedere in questo caso dimensioni dei pori ancora più piccole, circa 10 nm.

#### **1.4.2 Metodi di sterilizzazione chimici**

La crescita dei microrganismi può essere controllata mediante l'uso di agenti chimici in quei prodotti che non sopportano le condizioni di sterilizzazione dei processi precedentemente descritti. Un agente antimicrobico, che può essere sia naturale che di sintesi, è un composto chimico che uccide i microrganismi o ne inibisce la crescita. Le due differenti azioni vengono evidenziate attraverso il suffisso -cido, per la morte dei microrganismi, o -statico, per la sola inibizione, dopo il tipo di microrganismo su cui agiscono. È importante specificare come questa classificazione sia spesso arbitraria in quanto lo stesso composto può essere letale ad alte concentrazioni, mentre, a basse concentrazioni, può limitarsi ad avere effetto inibente.

Gli antisettici gassosi più utilizzati sono la formaldeide, l'ozono e l'ossido di etilene.

La formaldeide: è un gas irritante, tossico e poco penetrante e quindi utilizzabile solo come disinfettante di superficie, per sterilizzare oggetti e locali. Sempre più in disuso come trattamento a causa della elevata reattività e difficoltà nella rimozione da molti materiali.

L'ozono: oggi raramente utilizzato in quanto presenta un'azione fortemente ossidante che comporta l'alterazione di molti materiali con cui viene in contatto.

L'ossido di etilene: il vantaggio di questo gas è l'elevata penetrazione attraverso materiali come plastica, involucri di carta e polveri che permette il suo impiego per trattamenti di sterilizzazione su prodotti già sigillati nel loro contenitore definitivo (se permeabile al gas). D'altra parte lo svantaggio è quello di poter formare miscele esplosive con l'aria e quindi viene utilizzato miscelato con gas inerti come anidride carbonica o idrocarburi cloro-fluorurati. Si opera in autoclave a temperature comprese fra 35° e 55 °C, tenendo conto che la sua attività sterilizzante aumenta con la temperatura ed il trattamento richiede parecchie ore. È utilizzato per i materiali che non sono sterilizzabili in autoclave (PVC, polietilene, alcune gomme, ecc.).

### 1.4.3 Cinetica dell'inattivazione microbica

La cinetica di inattivazione microbica del 1° ordine è quella che troviamo in ogni processo di sterilizzazione (sia fisico, che chimico) che provoca la distruzione dei microrganismi.

La seguente equazione è alla base della cinetica di inattivazione

$$-\frac{dN_t}{dt} = K \cdot N_t$$

e per integrazione dà:

$$\log \frac{N_0}{N_t} = Kt \quad \text{eq. 1}$$

dove:

$N_t$  = numero di microrganismi vitali ad un certo tempo, t

$N_0$  = numero di microrganismi vitali all'inizio del processo

$N_0/N_t$  = grado di inattivazione

Per avere la sterilità effettiva, da  $N_0$  dovremmo arrivare a zero, ma l'Eq. 1 non è valida fino a  $N_t = 0$ , ma fino a valori di  $N_t$  non troppo bassi. E' considerata valida quindi comunque fino al tempo di riduzione decimale (D), cioè il tempo richiesto per la decimazione ( $N_0/N_t = 10$ ).

Per  $t=D$  e  $N_0/N_t=10$ , l'Eq. 1 diventa:

$$\log 10 = KD$$

da cui otteniamo:

$$D = \frac{1}{K}$$

considerando che  $n_u$  = numero di unità di dosaggio si ha:

$$N_0 = n_u N_u$$

dove  $N_u$  è il numero medio di germi in ogni unità di dosaggio, che è possibile determinare analizzando un campione prelevato dal lotto, con prove microbiologiche. Come già detto la norma UNI EN556-1:2002 considera un lotto sterile quando:  $n_u/N_t = 10^6$ .

Quindi il tempo a cui si ha:  $N_t = n_u 10^{-6}$  rappresenta il tempo di sterilizzazione che viene indicato con F. Ho che così l'Eq. 1 diventa:

$$\log(N_u 10^6) = \frac{F}{D}$$

da cui può essere calcolato F, tempo di sterilizzazione, che rimane l'unica incognita, in quanto  $N_u$  si determina con prove microbiologiche:

$$F = D (6 + \log N_u) \quad \text{eq. 2}$$

Visto che non sempre è possibile determinare  $N_u$  ovvero la contaminazione microbica iniziale, la F.U riporta delle condizioni di sterilizzazione standard per ogni tipo di forma farmaceutica.

Per quanto riguarda la determinazione del tempo di riduzione decimale relativo a una particolare specie microbica si può determinare applicando l'Eq. 1. Si produce una colonia selezionata di tale specie, si determina  $N_0$  con metodiche microbiologiche, si sottopone tale colonia al processo di inattivazione per tempi differenti, si determina  $N_t$  per ciascun tempo con metodiche microbiologiche, dopodiché si riporta in grafico il  $\log(N_0/N_t)$  rispetto al tempo.

Se l'Eq. 1 è rispettata, si ottiene una retta, dal cui coefficiente angolare, K, si calcola  $D=1/K$  utile a sua volta perché permette di calcolare il tempo teorico di sterilizzazione, tramite l'Eq.2.

#### 1.4.4 metodi di sterilizzazione analizzati

##### *-Sterilizzazione con vapore saturo (calore umido) in autoclave:*

L'inattivazione dei microrganismi in questo caso non è dovuta solamente all'aumento della temperatura ma anche all'ingresso di acqua all'interno della cellula. Questo avviene poiché la membrana cellulare è una membrana semipermeabile e avendo uno stato di massima attività termodinamica del vapore saturo (il vapore saturo è acqua in fase di vapore ed è in condizioni di equilibrio con l'acqua liquida pura) ma una condizione non di massima attività termodinamica per l'acqua nel citoplasma delle cellule dei microrganismi, si genera un processo osmotico di permeazione di acqua dall'esterno all'interno della cellula microbica.

In questo modo la denaturazione delle proteine plasmatiche da parte del vapore saturo avviene a temperatura più bassa e in tempi più brevi che non con il calore secco. La temperatura di sterilizzazione con vapore saturo riportata nella F.U. è 121°C e una pressione manometrica (pressione in eccesso rispetto alla pressione atmosferica) di circa 1 atmosfera mentre i tempi riportati vanno dai 15 ai 20 minuti.

L'autoclave è costituita da un contenitore in acciaio, dotato di una doppia porta che può essere chiusa ermeticamente dall'esterno. Posto nel contenitore il materiale da sterilizzare e serrato il coperchio, si fa penetrare all'interno, attraverso appositi condotti, il vapore acqueo proveniente da una caldaia e spinto nell'autoclave da una pompa. L'aria inizialmente contenuta nell'autoclave viene fatta uscire grazie ad una valvola di sfogo per l'aria, poiché il vapore è più caldo, più leggero dell'aria, esso tende a spingere l'aria verso il basso e a scacciarla dall'autoclave, pertanto la valvola si troverà sul fondo dello strumento e nel momento in cui dalla valvola fuoriuscirà solo vapore puro sarà possibile considerare l'aria completamente eliminata. Inoltre la verifica che l'aria all'interno dell'autoclave è stata completamente eliminata avviene in base alla correlazione tra temperatura e pressione in quanto ad una temperatura di 121°C, la pressione manometrica deve essere ~1atm, nel caso quest'ultima fosse significativamente maggiore di 1atm, ciò deriverebbe dalla presenza di aria nell'autoclave (tale pressione risulterebbe dalla somma della pressione parziale del vapore ~1atm, a 121°C e di quella dell'aria).

Va tenuto presente che tutte le forme di batteri, muffe, lieviti muoiono dopo soli pochi minuti di esposizione a 100 °C, e che le spore più resistenti (ad es. quelle del bacillo del tetano) muoiono a 115 °C in 15'. Normalmente una buona sterilizzazione viene protratta

per 20'. Si ha così la garanzia che tutte le forme patogene e non, di qualsiasi tipo sono morte e quindi il materiale all'interno dell'autoclave è perfettamente sterile.

Una parte fondamentale dello strumento è costituita dalle valvole di espansione che servono per portare le condizioni (temperatura e pressione) del vapore nella rete di distribuzione generale a valori più bassi per il processo di sterilizzazione.

Nei casi in cui si vadano a sterilizzare materie fibrose o porose in cui l'aria può rimanere intrappolata devo utilizzare pompe da vuoto che allontanano l'aria prima dell'entrata del vapore saturo in modo che si raggiungano le condizioni di sterilizzazione più rapidamente.

Una condizione necessaria prima di iniziare a misurare il tempo per la sterilizzazione è quello di valutare che la temperatura sia uguale e costante in ogni punto del materiale, in quanto in base alla sua massa, alla sua conducibilità termica e alla sua geometria si possono trovare zone meno accessibili al calore. Per determinare questa condizione vengono utilizzati vari tipi di indicatori localizzati nei punti più freddi del materiale:

- sostanze chimiche che fondono alla temperatura di sterilizzazione,
- strisce di carta impregnate con sostanze chimiche che cambiano colore per effetto dell'umidità e della temperatura.
- indicatori microbiologici, cioè delle ampole contenenti microrganismi: in base alla loro distruzione si può considerare avvenuta la sterilizzazione
- sonde termiche (es. termoresistenze)

Il tempo  $F_0$  viene definito dose di sterilizzazione indicato nella formula sottostante come  $F_{T^\circ}$ :

$$\sum \Delta t_{T^\circ} = F_{T^\circ} = \sum \Delta t_T \cdot 10^{\frac{T-T^\circ}{Z}}$$

La seguente equazione deriva dall'equazione:

$$\Delta t_{T^\circ} = \Delta t_T \cdot 10^{\frac{T-T^\circ}{Z}}$$

Z=fattore zeta, valore della variazione  $T-T^\circ$  ( $\sim 10^\circ\text{C}$ )

essa permette di calcolare l'intervallo virtuale di tempo alla temperatura di riferimento  $T^\circ$  che produrrebbe lo stesso grado di inattivazione nell'intervallo reale di tempo alla temperatura reale  $T$ . Se facciamo così la sommatoria degli intervalli di tempo virtuali calcolati alle diverse temperature, purché superiori a quelli della soglia di inattivazione, e fermiamo questa soglia al tempo di esposizione previsto  $T^\circ$  allora avremo somministrato una “dose di sterilizzazione” uguale a quella prevista dal processo standard e avremmo ottenuto la sterilizzazione.

Quindi  $F_0$  corrisponde all'intervallo di tempo in cui l'inattivazione ha inizio ed ha fine, considerando che l'inattivazione non avviene solo quando l'autoclave raggiunge i  $121^\circ$  ma che nella fase di riscaldamento il materiale è portato a temperature anch'esse in grado di fornire un certo grado di inattivazione.

La fase successiva di raffreddamento avviene tramite liberazione di getti di acqua da ugelli presenti nell'autoclave, questo provoca sia la riduzione di pressione che di temperatura. In questo caso abbiamo lo svantaggio che il materiale deve essere protetto dall'acqua ed asciugato tramite irraggiamento alla fine del processo, inoltre il fatto che la temperatura scenda sotto i  $20^\circ\text{C}$  creando così il vuoto (pressione di vapore 15-20mmHg) richiede l'immissione di aria sterile in modo da portare la pressione alla pressione atmosferica prima di aprire l'autoclave.

Per queste operazioni ci sono programmi automatici: i controller che programmano le varie fasi.

#### *- Sterilizzazione con Radiazioni ionizzanti*

La radiazione può essere definita come un modo di propagazione dell'energia nello spazio sotto forma di radiazioni elettromagnetiche (costituite da flusso di fotoni) o di particelle.

Trasferiscono la loro energia ad atomi e molecole colpite che perdono o guadagnano elettroni e si trasformano in ioni e/o radicali. Le radiazioni ionizzanti hanno bassa lunghezza d'onda ed elevato potere di penetrazione nella materia. Esse inducono danni strutturali nel DNA microbico che, se non riparati, porteranno all'inibizione della sintesi del DNA stesso o causeranno errori nella sintesi proteica provocando la morte della cellula. Il danno subito dalle cellule si misura in relazione all'energia assorbita per unità di massa. La dose assorbita si misura in Gray (Gy); un Gray corrisponde all'assorbimento di un joule in un kg di materia.



Queste radiazioni agiscono direttamente sugli acidi nucleici provocando rotture mono- o bi-catenarie, o indirettamente per ionizzazione dell'acqua e dell'ossigeno con conseguente formazione di radicali liberi e perossidi che denaturano le macromolecole ossidandole. Le forme vegetative dei batteri sono le più sensibili alle radiazioni, sebbene *Deinococcus radiodurans* sia l'organismo più resistente conosciuto, seguono le muffe e i lieviti mentre le spore batteriche e i virus sono più resistenti. I prioni, privi di acidi nucleici, sono altamente resistenti. La resistenza microbica, comunque, diminuisce in presenza di umidità o ossigeno disciolto.

Le radiazioni ionizzanti comprendono:

- raggi gamma: sono radiazioni elettromagnetiche ad altissima frequenza costituite da un flusso di fotoni. Vengono generati nel nucleo atomico di elementi radioattivi quali il cobalto-60 o il cesio-137.
- raggi X: hanno una minore frequenza e vengono generati dall'urto di elettroni accelerati mediante un generatore elettrico contro un bersaglio metallico (tungsteno o platino);
- raggi catodici  $\beta$ : sono radiazioni particellari costituite da elettroni accelerati, necessitano quindi di un catodo che emette elettroni ed un acceleratore di elettroni (Carione et al., 2010).

#### *Metodo di sterilizzazione con raggi $\gamma$ adottato da Farmigea*

Il sistema è costituito da una cellula blindata, in alcuni casi climatizzata di grandezza variabile da decine di metri ad alcuni centinaia. Al centro della cellula si trovano su appositi supporti in metallo le “sorgenti” di radiazione rappresentate da isotopi radioattivi di Co e Cs. Il materiale viene fatto circolare intorno alla sorgente attraverso vari metodi di movimentazione in modo da assicurare una dose di radiazioni più omogenea possibile.

I sistemi industrialmente utilizzati sono 3:

- 1) ionizzatori ad unità di sterilizzazione
- 2) ionizzatori a balancelle
- 3) ionizzatori a pallet

Farmigea ha utilizzato un metodo di ionizzazione a pallet basato sull'irraggiamento di materiale già localizzato in contenitori standard idonei anche ad altri settori del processo di produzione (incluso trasporto finale). Questo costituisce il vantaggio fondamentale del processo in quanto evita il danneggiamento del materiale a causa della manipolazione e

evita il processo di immissione e rimozione delle scatole di prodotto dai contenitori di irraggiamento prima e successivamente alla fase di sterilizzazione, avvalendosi proprio di un contenitore unico ed idoneo alle varie fasi (Mehta et al., 2008).

#### *Metodo di sterilizzazione con raggi $\beta$ adottato da Farmigear*

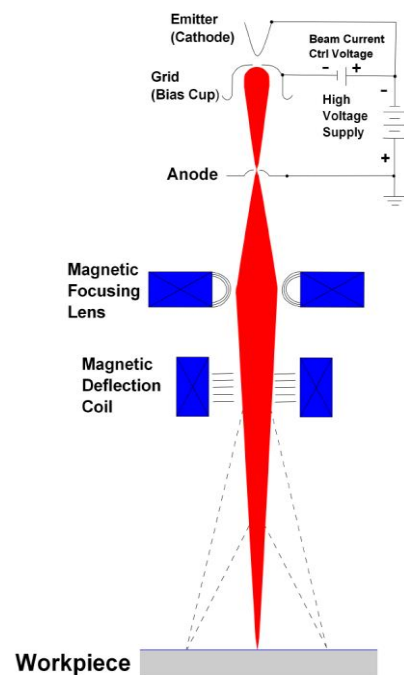
Il metodo adottato da Farmigear per la sterilizzazione del device con raggi beta prende il nome di “electron beam processing” che come si osserva nella figura è rappresentato da un impianto di sterilizzazione formato da:

1) sorgente della radiazione costituita da

- Un tubo elettronico (costituito da un catodo, griglia e anodo) viene utilizzato per generare e accelerare il fascio primario.
- Un sistema ottico magnetico (focalizzazione e deflessione) è utilizzato per controllare la direzione del fascio di elettroni che deve andare a colpire il materiale.

Nel funzionamento, il catodo è la sorgente di elettroni emessi termicamente da un filamento di tungsteno incandescente, questi vengono accelerati con un sistema a micro-onde in un tubo sotto vuoto grazie alla generazione di un campo elettrostatico, oppure da un campo elettromagnetico e “sparati” all’esterno del tubo acceleratore attraverso una sottile finestra di titanio. Grazie a magneti adeguatamente calibrati, gli elettroni vengono guidati e condotti a contatto del materiale da trattare.

In pratica, un flusso di elettroni ad altissima potenza (circa 1 MeV) viene generato da una sorgente lineare applicando una intensa differenza di potenziale ad un sistema anodo/catodo.



2) il sistema di nastro trasportatore che permette al materiale di giungere al raggio.

3) il Bunker in cemento armato o struttura analoga che racchiude il sistema di generazione degli elettroni e la zona di trattamento vera e propria, schermandola completamente.

È importante in questi casi poter controllare l'intensità, essa deve essere abbastanza bassa da non creare radioattività indotta nel materiale colpito cioè deve riuscire a produrre la

ionizzazione estraendo gli elettroni dagli orbitali, ma non deve interagire con il nucleo in modo da renderlo radioattivo.

Anche in questo caso occorre controllare che la dose assorbita sia la medesima in ogni punto del materiale e questo viene fatto con dei dosimetri. Uno dei dosimetri più utilizzati è il polimetilmetacrilato rosso che cambia densità ottica quando assorbe energia radiante oppure etichette di PVC che attaccano il materiale e cambiano colore quando questo è irradiato per liberazione di HCl che interagisce con un indicatore di pH che lo mette in evidenza.

Svantaggi delle radiazioni ionizzanti:

- Alterazioni dei materiali di confezionamento
- Costi elevati
- Alcuni materiali come il PVC non supportano questo trattamento
- Le soluzioni acquose non possono essere sterilizzate con raggi  $\gamma$  in quanto l'acqua e i materiali che ne sono ricchi verrebbe radiolizzata e trasformata in specie altamente reattiva che può andare a degradare i principi attivi
- Il materiale non deve contenere nemmeno molta aria perché l'ossigeno con l'irraggiamento tende a trasformarsi in ozono ( $O_3$ ) con caratteristiche ossidanti (spesso viene infatti fatto il vuoto nella confezione).

Come già visto nel paragrafo dell'inattivazione microbica nell'Eq. 1 per un certo grado di inattivazione  $\frac{N_0}{N_t}$  supponiamo che sia stato somministrato ai microrganismi una dose di

inattivazione corrispondente a  $Kt$ . Di conseguenza  $Kt$  viene considerata proporzionale all'energia radiante assorbita dal materiale, quindi  $K$  è proporzionale alla potenza della radiazione ovvero all'energia radiante assorbita dal materiale nell'unità di tempo. La potenza è correlata all'intensità della radiazione che corrisponde all'energia radiante che attraversa un piano di superficie unitaria nell'unità di tempo. L'intensità a sua volta dipende dalla frequenza e dalla distanza tra la sorgente della radiazione e il materiale irraggiato.

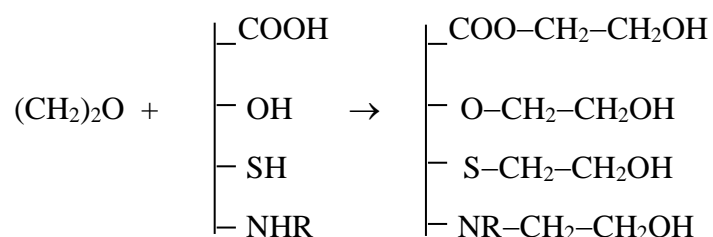
Quindi per controllare il processo di sterilizzazione con radiazioni bisogna conoscere la distanza tra il materiale e la sorgente e così la frequenza della radiazione e l'intensità (la direzione della radiazione deve essere perpendicolare alla superficie per massimizzare l'intensità).

Le sterilizzazioni con radiazioni gamma e beta avvengono in accordo con la norma ISO 1137 che si occupa di specificare i requisiti per lo sviluppo, la convalida ed il controllo sistematico di un processo di sterilizzazione per dispositivi medici, di definire la dose sterilizzante, e di fornire una guida sugli aspetti dosimetrici.

#### *- Sterilizzazione con Ossido di etilene:*

E' un agente alchilante molto reattivo e rientra tra i processi di sterilizzazione con mezzi chimici. È un gas incolore che ha un punto di ebollizione a pressione atmosferica di 10,4°C, pertanto a temperatura inferiori ai 10°C lo troviamo come liquido incolore. Si ottiene per ossidazione di etilene in aria o in ossigeno in presenza di un catalizzatore di ossido d'argento. Reagisce con gli H attivi dei gruppi funzionali delle proteine che rappresentano i metaboliti essenziali per i microrganismi.

La reazione dell'ossido di etilene è una reazione di alchilazione:



Dove l'idrogeno attivo è sostituito da un gruppo idrossietilico. La modificazione del metabolita essenziale per la cellula microbica provoca la morte della cellula stessa.

Essendo una molecola di piccole dimensioni presenta un elevatissimo coefficiente di diffusione in materiali come cartone, carta e plastica per questo viene utilizzato per i materiali di confezionamento.

L'utilizzo dell'ossido di etilene (concentrazione al 10%) avviene generalmente insieme a gas non infiammabili come anidride carbonica o miscele di idrocarburi cloro-fluorurati (freon) in quanto brucia molto facilmente in presenza di ossigeno e può dare luoghi anche ad esplosioni.

Il tempo di sterilizzazione (F) espresso anche qui dall'Eq. 2 dipende da molti fattori, in particolare modo dalla concentrazione dell'ossido di etilene (pressione parziale) nella miscela con il gas infiammabile, dalla temperatura come in tutte le costanti di velocità e dal quantitativo di umidità presente nell'ambiente in cui avviene la sterilizzazione.

Questo fattore è importantissimo in quanto per l'apertura dell'anello epossidico e quindi per far avvenire l'alchilazione devono essere disponibili  $H^+$ , tanti più  $H^+$  sono disponibili più il processo di inattivazione sarà rapido.

Si stabilisce così un equilibrio termodinamico tra l'acqua nell'atmosfera che circonda il materiale e il materiale stesso, ma il quantitativo di acqua non deve essere troppo elevato altrimenti l'ossido di etilene che è solubile in acqua diminuisce troppo la sua attività termodinamica. In genere l'umidità relativa ottimale è quella del 40-50%. La diffusione dell'ossido di etilene è accelerata dall'aumento quindi della temperatura e dell'umidità, in particolar modo per un incremento della temperatura di  $10^{\circ}C$  ho che il tempo di riduzione decimale diminuisce circa tre volte:  $D_{T^{\circ}} = D_T \cdot \vartheta^{(T-T^{\circ})}$

Per l'ossido di etilene  $\vartheta \cong 1.11$  dai  $5^{\circ}$  a  $40^{\circ}C$ .

Lo strumento è costituito da:

- una camera di sterilizzazione di acciaio inox (autoclave) con chiusura ermetica che presenta una camicia per la termostatazione con acqua calda,
- un sistema di aspirazione per l'evacuazione per la camera,
- un sistema di riscaldamento,
- una fonte di vapore acqueo per il giusto grado di umidità,
- sistema per volatilizzare l'EtO all'interno della camera
- un sistema di controllo continuo di tutti i parametri di sterilizzazione.

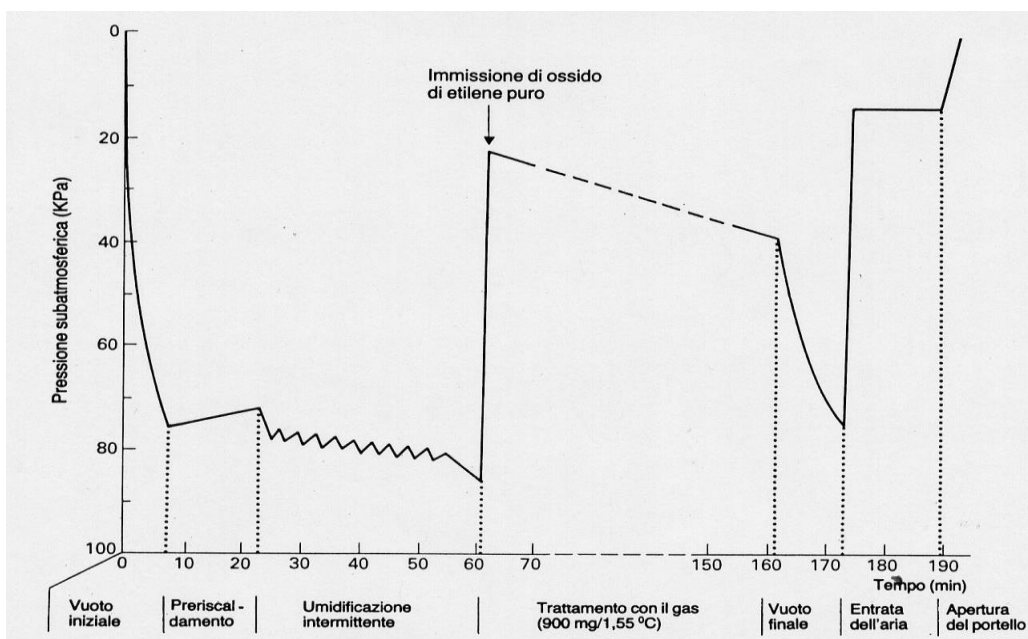


Fig 6. Tipico ciclo della sterilizzazione con Ossido di etilene puro.

Come si può osservare nella figura 6 i processi di sterilizzazione con ossido di etilene possono essere descritti così:

Fase 1: viene fatto il vuoto iniziale nell'autoclave soprattutto con i materiali fibrosi che tendono ad intrappolare l'aria

Fase 2: viene introdotto vapore d'acqua fino al valore di umidità relativo (processo che viene fatto prima dell'aggiunta di altri gas per essere sicuri che venga assorbito il vapore d'acqua). Necessita della presenza di una valvola ad espansione per portare il vapore dalla rete di distribuzione ad una pressione e temperatura più bassa, con l'aggiunta di questo in piccoli getti per evitare la saturazione. Conoscendo la temperatura (50-55°C), regolata mediante un termostato e quindi conoscendo anche la tensione di vapore saturo a quella temperatura, per raggiungere il valore desiderato dell'umidità basta raggiungere una pressione nell'autoclave tale che il rapporto tra tale pressione e la tensione di vapore saturo sia uguale a 0,5-0,6.

Fase 3: umidificazione intermittente dove è necessario un po' di tempo per il condizionamento del materiale e l'idratazione dei microrganismi da parte del vapore.

Fase 4: aggiunta della miscela di EtO alla temperatura già voluta, fino a raggiungere la pressione di esposizione.

Fase 5: si mantiene questa condizione per un tempo prestabilito.

Fase 6: allontanamento del gas tramite pompa a vuoto.

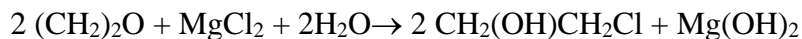
Fase 7: lavaggi ripetuti per eliminazione dell'ossido etilene tossico (per lavaggio intendiamo, fare il vuoto nell'autoclave introdurre aria sterilizzata per filtrazione, fino a raggiungere la pressione atmosferica e ripetere questi passaggi per un certo numero di volte).

Ci sono due motivazioni per cui l'ossido di etilene non può essere utilizzato per sterilizzare il confezionamento già riempito: se il farmaco contiene  $H^+$  attivi l'EtO reagisce con questi e il farmaco viene inattivato, inoltre le soluzioni acquose non si sterilizzano direttamente con tale metodo in quanto il coefficiente di attività termodinamica dell'EtO in soluzione acquosa risulterebbe troppo basso.

Come già visto per gli altri processi di sterilizzazione una fase fondamentale risulta la fase di monitoraggio del processo di sterilizzazione dove vengono utilizzati indicatori, in

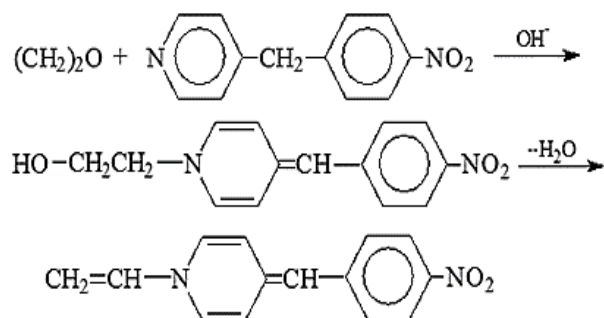
particolar modo reagenti chimici, che reagendo con EtO danno luogo alla formazione di glicole etilenico o cloridina etilenica.

Questo secondo caso è dato dalla seguente reazione:



Per dosare il quantitativo di ossido di etilene aggiunto andiamo a far svolgere la reazione con un quantitativo controllato di HCl così che l'indicatore di pH (che valuta la formazione di  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ) non indicherà un pH alcalino fino a che tutto l'HCl non si sarà consumato, dosando quindi HCl sarà possibile tarare l'indicatore.

L'altro indicatore chimico molto utilizzato è il 4-(p-nitrobenzil)piridina che genera un composto azzurro.



La sterilizzazione con Ossido di Etilene viene effettuata in accordo con la norma ISO 1135-1: 2007 che si occupa di specificare i requisiti per lo sviluppo, la convalida ed il controllo sistematico di un processo di sterilizzazione ossido di etilene per i dispositivi medici.

## 1.5 Saggi di stabilità

I saggi di stabilità sono da sempre un tassello fondamentale nello sviluppo di nuovi farmaci e nella verifica della loro attività ed efficacia.

Un confronto fra le F.U inglesi, francese, italiana e danese ha permesso di osservare una divergenza nel protocollo di analisi da eseguire sui vari prodotti farmaceutici per verificarne la stabilità. Come sviluppo a questa problematica è stato istituito nel 1980 l'International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), con lo scopo di armonizzare i requisiti tecnici per la registrazione dei prodotti farmaceutici fra U.E., Giappone e U.S.A.

Le "Quality Guidelines" ICH forniscono i protocolli da seguire negli studi sulla Stabilità, sulla ricerca di impurezze ma anche su validazioni analitiche, buone norme di fabbricazione e molte altre pratiche fondamentali per lo sviluppo di una "New Chemical Entity".

La stabilità si può definire come il periodo che intercorre tra il momento della preparazione del farmaco ed il momento in cui la sua efficacia non appare ridotta di un valore superiore al 10%. Considerando che non esistono farmaci completamente stabili in quanto influenzati da condizioni ambientali, natura della forma farmaceutica, tecniche di produzione, è opportuno indicare come non solo una riduzione del titolo di principio attivo maggiore del 10% sia sinonimo di instabilità, ma anche la formazione di prodotti di degradazione non privi di effetto possa determinare l'instabilità della forma farmaceutica.

Possiamo pertanto far riferimento alla definizione di stabilità riportata sulla Farmacopea Ufficiale Italiana, "la perdita d'attività di un medicamento non è ammessa oltre i limiti in cui l'effetto biologico o terapeutico si modifica, ovvero si ha un cambiamento della tossicità in generale".

L' Obiettivo che uno studio di stabilità si prefigge è di fornire evidenza su come la qualità di un principio attivo possa variare sotto l'influenza di fattori di natura fisica, chimica e biologica: il tempo di conservazione, la temperatura, il pH, la luce, il veicolo, il contenitore, l'umidità, l'ossidazione, la contaminazione biologica, le incompatibilità sostanze associate.

Come appena accennato un ruolo fondamentale è svolto dal tipo di contenitore utilizzato per la conservazione che deve fornire garanzia di protezione del farmaco dagli agenti esterni quali l'umidità, i gas, i solventi, gli aromi, la luce ma deve inoltre essere



chimicamente e fisicamente inerte nei confronti del farmaco onde evitare fenomeni di migrazione contenitore-contenuto, adsorbimento di principi attivi o conservanti da parte del contenitore ed estrazione di particelle da parte del contenuto.

Tali saggi vengono effettuati sia mantenendo i campioni in stufe ventilate che riproducono le condizioni ambientali (Temperatura, umidità), che in condizioni “accelerate” con temperature superiori a quelle della normale conservazione del prodotto farmaceutico.

Le prove di stabilità accelerate servono per aumentare le possibili alterazioni del campione, visto che le condizioni di stress abbreviano il tempo richiesto per ottenere le necessarie informazioni sulla stabilità e quindi sul periodo di validità della relativa formulazione.

I saggi di stabilità effettuati sono stati:

*-titolo del principio attivo ed eventuale presenza di impurezze*

*- viscosità*

*-osmolarità*

*-pH*

## Capitolo 2

### Introduzione alla parte sperimentale

Sono noti da anni gli effetti tossici che una lunga esposizione dell'occhio ai colliri contenenti conservanti hanno sulla cornea. Uno dei conservanti più usati in oftalmologia è il Benzalconio cloruro (BAK), la sua elevata attività detergente induce una denaturazione delle proteine con cui viene a contatto e provoca modificazioni enzimatiche irreversibili a carico delle membrane cellulari. Il meccanismo d'azione antibatterico del BAK è quindi legato alla sua capacità di alterare la membrana cellulare modificandone la permeabilità, con perdita di enzimi, coenzimi e conseguente inattivazione del microrganismo. In letteratura sono riportati i seguenti effetti collaterali che il BAK è dimostrato provochi nell'occhio:

- altera il film lacrimale precorneale (riduce significativamente il BUT);
- è un agente proinfiammatorio (determina un aumento di alcuni marker dell'infiammazione (per es. ICAM-1, HLA-DR, ecc.);
- è epitelio-tossico (determina cheratite puntata) e ritarda la riepitelizzazione;
- riduce il numero di cellule caliciformi nella congiuntiva;
- a lungo termine determina una metaplasia squamosa della congiuntiva;
- è tossico per lo stroma corneale (non va usato in caso di estese disepitelizzazioni): può indurre sia apoptosi che necrosi (a secondo della quantità somministrata) dei cheratociti;
- è estremamente tossico per le strutture intraoculari, pertanto non deve mai essere usato in presenza di aperture (traumatiche o chirurgiche) della camera anteriore;
- può determinare allergie.

Per questo l'attenzione dell'industria farmaceutica si è rivolta alla preparazione di colliri monodose, ovvero di quei colliri usa e getta che non hanno bisogno di aggiunta di conservanti. Tuttavia tali tipi di confezionamento comportano un maggior costo di produzione e quindi un maggior prezzo del prodotto. Per questo recentemente diverse aziende hanno studiato e immesso sul mercato confezionamenti per colliri multidose non contenenti conservanti e che impiegano confezionamenti primari costituiti da contenitori provvisti di valvole apposite che consentono l'erogazione del collirio e l'ingresso nel flacone di aria passata attraverso un filtro sterilizzante.

L'obiettivo della presente tesi è stato quello di studiare l'effetto sulla stabilità del collirio a base di Ketotifene fumarato, di varie tecniche di sterilizzazione del confezionamento primario multidose. Infatti Farmigea ha provveduto a far sterilizzare i flaconi impiegando tecniche di sterilizzazione differenti: radiazioni ionizzanti (beta o gamma) oppure autoclavatura con vapore saturo o con ossido di etilene.

## **2.1 Materiali e Metodi**

### **2.1.1 Metodi di sterilizzazione**

#### ***STERILIZZAZIONE CON RAGGI BETA***

La dose minima per tutta la campionatura era di 16KGy che veniva ottenuta mediante singoli passaggi sotto l'electron beam. In particolare i trattamenti effettuati sui flaconi erano con 20 kGy erogati in un singolo passaggio

#### ***STERILIZZAZIONE CON RAGGI GAMMA***

La sterilizzazione avviene mediante esposizione a fonte di radiazione Cobalto 60.

La dose di irraggiamento minima è 25.0 KGy

Il trattamento, chiamato "Overkill" assicura un totale abbattimento della carica microbiologica dei materiali.

#### ***STERILIZZAZIONE CON OSSIDO DI ETILENE***

Questo tipo di sterilizzazione veniva condotto in autoclave e prevedeva una fase iniziale dove veniva effettuato il vuoto con una durata di 30 minuti fino al raggiungimento di una pressione di -80KPa. Successivamente l'ossido di etilene veniva immesso in miscela con un gas non infiammabile (Freon o Anidride carbonica) il cui peso miscelato risultava di 90 Kg. Il tempo di immissione del gas risultava di 60 minuti mentre il condizionamento era di 2 ore ( $\pm 15$  min.) con il raggiungimento di una pressione interna all'autoclave maggiore di 100KPa. La sterilizzazione veniva condotta a 50 ( $\pm 2$ ) °C ad una umidità relativa  $> 60\%$  e alla concentrazione di ossido di etilene 321 g/m<sup>3</sup>. La sterilizzazione si protraeva per 6 ore ( $\pm 15$  min) dove nella fase finale si assisteva all'allontanamento dell'ossido di etilene facendo nuovamente il vuoto nell'autoclave e raggiungendo una pressione di -80KPa, con un tempo di evacuazione del gas di 45 minuti. Seguita da un lavaggio finale che durava 30 ( $\pm 15$ ) min e che veniva ripetuto 3 volte.

#### ***STERILIZZAZIONE IN AUTOCLAVE***

La sterilizzazione è avvenuta in una Autoclave Fedegari FOF/5, ad una Temperatura di sterilizzazione 121°C con un tempo di sterilizzazione (metodo F0) 40'. Il raffreddamento del materiale avviene attraverso getti d'acqua da ugelli.

### 2.1.2 Prove di stabilità dei colliri

I flaconi venivano mantenuti a temperatura costante a 25°C oppure a 40°C in stufa ventilata. Le prove hanno avuto una durata complessiva di 3 mesi e venivano effettuate ad intervalli di tempo prestabiliti di 1 mese oppure 15 giorni per i flaconi mantenuti a 25°C oppure a 40°C, rispettivamente.

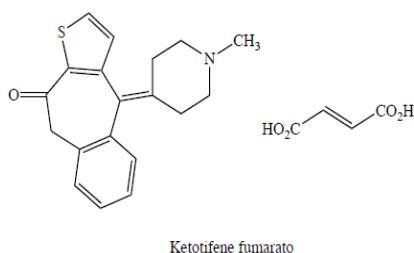
### 2.1.3 Determinazione della concentrazione del Ketotifene Fumarato.

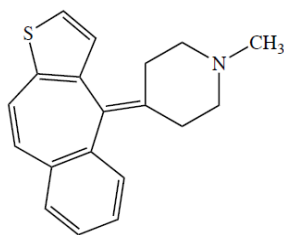
Strumentazione: L'apparato (Perkin-Elmer) era costituito da una pompa Series 200, un iniettore 20 µL Rheodyne, un detector spettrofotometrico UV/vis LC 290 e un software Turbochrom Navigator HPLC per l'integrazione dei dati. Fu utilizzata una colonna Spheri-5 (RP 18, 5 µm 250x4.6 mm), la fase mobile era costituita da tetrabutylammonio solfato 0.05M/metanolo (60:40) (flusso 1.0 ml/min) e il detector era impostato ad una lunghezza d'onda di 210 nm. Per il Ketotifene fumarato e le impurezze sono stati determinati sia il valore di concentrazione minima determinabile (sigla, LOD) che il valore minimo di quantificazione (sigla, LOQ).

Analita	LOD, µg/ml	LOQ, µg/ml
Ketotifene fumarato	0.09	0.26
Impurezza A	0.18	0.53
Impurezza B	0.16	0.49
Impurezza D	0.28	0.85

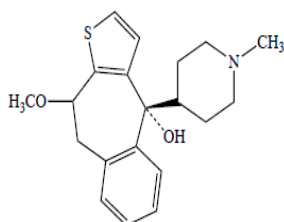
Tab.1 LOD e LOQ di Ketotifene fumarato e delle sue principali impurezze

La messa a punto di questo metodo analitico ha permesso di ottenere separazione tra i picchi del principio attivo e delle sue principali impurezze, di cui si riporta di seguito la struttura chimica.

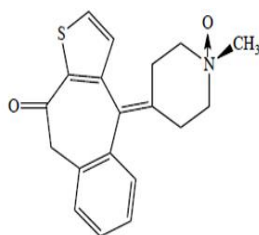




**Impurezza A:** 4-(4H-benzo [4,5]cicloepa [1,2-b] tiofen-4-ilidene)-1-metilpiperidina



**Impurezza B:** (4-RS)-10-metossi-4-(1-metilpiperidina-4-ile)-4H-benzo-[4,5]cicloepa[1,2-b]tiofen-4-olo



**Impurezza D:** 4-[(R,S,S)-1-metilpiperidin-4-ilidene]-4,9-diidrossi-10H-benzo[4,5]-cicloepa[1,2-b]tiofen-10-one N-ossido

Per il Ketotifene fumarato e per ciascuna delle sue impurezze è stata costruita pertanto una retta di taratura e determinato il valore di  $r^2$ , che risultava sempre superiore a 0.995. Ogni volta che veniva fatta l'analisi del contenuto del principio attivo nel collirio veniva precedentemente effettuata la calibrazione con concentrazioni variabili da 0.005mg/ml a 0,00125mg/ml.

#### Preparazione eluente:

Tetrabutylammonio solfato 0,05M: sono stati messi 1,438 ml della soluzione di tetrabutylammonio solfato in un matraccio da 500 ml e portato a volume con acqua MilliQ. Successivamente la soluzione è stata filtrata con filtro di acetato di cellulosa con dimensione dei pori di 0,45 $\mu$ m. Il treabutylammonio solfato 0,05M(TBAS) è stato posto in cilindro graduato ed è stato aggiunto metanolo nei seguenti rapporti volumetrici (metanolo:TBAS): 80:20, 70:30, 60:40, 50: 50, 10: 90, 40: 60.

Prima del suo utilizzo l'eluente è stato degasato in bagno ad ultrasuoni per 30 min.

Preparazione campioni per messa a punto del metodo:

*Soluzione madre di Ketotifene base:* sono stati pesati esattamente 0,001 g di Ketotifene base libera e portato a volume con metanolo in matraccio da 20 ml ottenendo una concentrazione di API pari a 0,05 mg/ml.

*Soluzione madre impurezza A:* in matraccio tarato da 10 ml sono stati pesati esattamente 10mg di impurezza A standard. È stato portato a volume con metanolo ottenendo una concentrazione di impurezza pari a 1,0mg/ml (soluzione A1)

La soluzione A1 veniva diluita 1:200 in metanolo ottenendo una concentrazione di impurezza pari a 0,005 mg/ml. Conservazione in frigorifero (0-8°C) per 1 mese massimo.

*Soluzione madre impurezza B:* in un matraccio tarato da 10 ml sono stati pesati esattamente 10mg di impurezza B standard. È stato portato a volume con metanolo ottenendo una concentrazione pari allo 1,0 mg/ml (soluzioni B1). La soluzione B1 veniva diluita 1:200 in metanolo ottenendo una concentrazione di impurezza pari allo 0,005 mg/ml. Conservazione in frigorifero (0-8°C) per 1 mese massimo.

*Soluzione madre impurezza D:* in un matraccio tarato da 10 ml sono stati pesati esattamente 10mg di impurezza D standard. È stato portato a volume con metanolo ottenendo una concentrazione pari allo 1,0 mg/ml (soluzioni D1). La soluzione D1 veniva diluita 1:200 in metanolo ottenendo una concentrazione di impurezza pari allo 0,005 mg/ml. Conservazione in frigorifero (0-8°C) per 1 mese massimo.

Preparazione campioni Ketoftil®: sono stati diluiti 0,5 ml di Ketoftil® commerciale in 4,5 ml di metanolo (dil. 1:10) e successivamente centrifugati a 6000 RPM per 10 min con centrifuga da banco a causa della precipitazione del TS-polisaccaride in metanolo. 0,50 ml del surnatante sono stati posti in un matraccio da 10ml e portati a volume con metanolo. Ottenendo così una diluizione 1:200.

#### 2.1.4 Determinazione dell'osmolarità dei colliri

Per la determinazione della osmolarità dei colliri veniva utilizzato un metodo di determinazione dell'Osmolarità è a "Punto di congelamento".

L'Osmometro è un Osmomat 030 della Gonotec. In pratica l'Osmolarità della soluzione veniva calcolata in funzione dell'abbassamento crioscopico, secondo la relazione:

$Osm = \Delta T / K$  dove K è la costante crioscopica (1.858 °C Kg/Osmol).

### 2.1.5 Determinazione della viscosità dei colliri

Per la determinazione della viscosità veniva utilizzato un viscosimetro rotazionale Brookfield (modello LVDV II il software era DV GATHER). Accessori: Small Sample Adapte, Spindle SC 4/18, 13R chamber. Per ciascuna soluzione venivano effettuate misure di viscosità nell'intervallo di velocità di rotazione 85-120rpm. Furono registrati i valori di viscosità a 85, 90, 100, 110 e 120 rpm per valutare il comportamento reologico della soluzione. In tutti i casi si osservava una diminuzione dei valori di viscosità all'aumentare della velocità di taglio indicando così un comportamento pseudoplastico.

Per calcolare il valore della viscosità il software DV GATHER (o RHEOCALC software), si avvale dei seguenti parametri:

SPINDLE	ENTRY CODE	SMC	SRC	TK
Spindle SC4/18	18	3,2	1,32	0,09373

E delle seguenti formule:

$$\text{Viscosity (cP)} = 100/\text{RPM} * \text{TK} * \text{SMC} * \text{Torque}$$

$$\text{Shear Rate (1/Sec)} = \text{RPM} * \text{SRC}$$

$$\text{Shear Stress (Dynes/Cm}^2\text{)} = \text{TK} * \text{SMC} * \text{SRC} * \text{Torque}$$

RPM = velocità di rotazione dello spindle

TK = costante di torsione del viscosimetro

SMC = costante di spindle

SRC = costante del gradiente di velocità

Torque = % di torsione del viscosimetro



## **2.2 Risultati e discussione**

Ketoftil® è commercializzato da Farmigea in flaconi multidose contenenti Benzalconio cloruro come conservante, e in flaconi monodose non contenenti conservante. La soluzione ha pH 5.4 e non contiene sali, dunque non è tamponata. Infatti è stato dimostrato che il ketotifene fumarato è poco stabile in soluzioni tamponate a diversi pH 5, 5.5 e 6 (Bryant et al., 2010).

La formulazione contiene sorbitolo che ha il compito di garantire la isotonicità del collirio. Infine contiene il polisaccaride estratto dalla gomma di tamarindo (TSP) come viscosizzante, allo scopo di prolungare il tempo di residenza del farmaco nell'area precorneale. Per questo motivo per valutare la stabilità del collirio oltre a monitorare la dose di ketotifene fumarato, sono stati monitorati il pH, l'osmolarità e la viscosità, quest'ultima al fine di valutare la stabilità del TSP. Le prove di stabilità sono state condotte parallelamente mantenendo il collirio a 25°C e a 40°C. La temperatura più alta è stata scelta per accelerare eventuali processi di degradazione, dal momento che lo studio non poteva durare più di 3 mesi.

Le condizioni di stabilità accelerata a 3 mesi corrispondono ad una stabilità in condizioni di temperatura e umidità ambientale di 1 anno.

### **2.2.1 Separazione impurezze**

Le figure 1, 2, e 3 mostrano i cromatogrammi del ketotifene fumarato insieme alle sue principali impurezze: A, B e D, rispettivamente. In tutti i casi si osserva una netta separazione del picco relativo al farmaco (tempo di ritenzione, TR 6.1 min) da quelli relativi alle varie impurezze (Impurezza A, TR 14.4 min; Impurezza B, TR 8.4 min; Impurezza D, TR 7.6 min). Ciò ha consentito la contemporanea determinazione del ketotifene fumarato e delle sue impurezze A, B e D che si formano più di frequente come prodotti di degradazione del ketotifene fumarato in soluzione.

### **2.2.2 Determinazione concentrazione Ketotifene Fumarato**

Le figure 4a e 4b mostrano la percentuale di Ketotifene fumarato presente nel collirio mantenuto a 25 o a 40°C dopo intervalli di tempo prestabiliti dalla preparazione, dove si vede in tutti i casi una diminuzione progressiva di tale percentuale nel tempo sia nel caso dei flaconi mantenuti a 25°C che di quelli mantenuti a 40°C. Tuttavia in nessun

cromatogramma sono presenti picchi relativi alle impurezze probabilmente perché anche qualora si fossero formate la loro concentrazione sarebbe inferiore al limite analitico (LOD). Se si confrontano i dati a 45 giorni nella figura 4b, relativi ai flaconi mantenuti a 40°C, si può affermare che nel caso della sterilizzazione dei flaconi effettuata con raggi gamma o con raggi beta la degradazione del Ketotifene fumarato segue una cinetica più rapida rispetto al collirio conservato nei flaconi autoclavati. Ciò indica che i flaconi sterilizzati con radiazioni ionizzanti probabilmente a causa di una maggior presenza sulle pareti dei flaconi di residui radicalici generano una degradazione maggiore del principio attivo.

### 2.2.3 Determinazione del pH del collirio

Le figure 5a e 5b mostrano i valori di pH del collirio mantenuto a 25°C o a 40°C dopo intervalli di tempo prestabiliti dalla preparazione. Si osserva nel tempo una progressiva diminuzione del pH delle soluzioni nel caso dei flaconi mantenuti a 40°C. Tale diminuzione non era altrettanto chiara nei campioni mantenuti a 25°C. Ciò indica che la degradazione porta nel tempo alla formazione di specie meno basiche che danno luogo alla liberazione di acido fumarico. I dati riportati in figura 5b, relativi ai flaconi mantenuti a 40°C, mostrano chiaramente una maggiore stabilità del collirio confezionato in flaconi autoclavati, infatti mentre in questo caso si osserva una stabilità del pH fino a 45 giorni, negli altri casi, cioè del collirio confezionato in flaconi sterilizzati con raggi gamma e beta, si osserva una diminuzione del pH già dopo 30 giorni dalla preparazione fino a raggiungere una diminuzione più marcata dopo 3 mesi, con una discesa fino a pH 5.

### 2.2.4 Determinazione dell'osmolarità del collirio

Le figure 6a e 6b mostrano i valori di osmolarità del collirio mantenuto a 25°C o a 40°C dopo intervalli di tempo prestabiliti dalla preparazione. Anche in questo caso si osserva una diminuzione della osmolarità dei colliri, siano essi mantenuti a 25°C che a 40°C, rispetto al valore iniziale.

Ciò indica che la degradazione porta alla formazione di specie aventi minore forza ionica rispetto al principio attivo e agli eccipienti contenuti nel collirio.

Tuttavia in nessun caso l'osmolarità scende al di sotto di valori particolarmente significativi ovvero al di sotto di quei valore che possono risultare irritanti e dannosi per l'occhio (inferiore a 150 mOsm).

### 2.2.5 Determinazione viscosità colliri Ketoftil®

Le figure 7a e 7b mostrano come varia la viscosità misurata alla velocità di rotazione di 100 rpm corrispondente alla velocità di taglio di  $132 \text{ sec}^{-1}$  del collirio mantenuto a  $25^\circ\text{C}$  o a  $40^\circ\text{C}$  dopo tre mesi dalla preparazione. Si osserva una diminuzione della viscosità che indica una degradazione anche dell'agente viscosizzante presente nel collirio cioè del polisaccaride estratto dalla gomma di tamarindo. Infatti trattandosi di un polisaccaride si può ipotizzare una parziale depolimerizzazione provocata dai residui radicalici che si formano sulle pareti interne dei flaconi sterilizzati con le diverse tecniche descritte.

Questi dati indicano che le varie tecniche di sterilizzazione dei flaconi che utilizzano radiazioni ionizzanti o calore comportano la degradazione del Ketotifene fumarato. Questa degradazione è verosimilmente causata da reazioni radicaliche provocate dai suddetti processi di sterilizzazione.

### 2.2.6 Determinazione stabilità con ossido di etilene

Si è invece riscontrata la stabilità di Ketoftil® quando i flaconi erano sterilizzati con ossido di etilene (grafico non riportato), infatti dopo 3 mesi dalla preparazione sia i campioni mantenuti a  $40^\circ\text{C}$  che quelli mantenuti a  $25^\circ\text{C}$  il rapporto tra la concentrazione iniziale e quella dopo tre mesi di Ketotifene fumarato nel collirio era sempre 100%.

## Capitolo 3

### Conclusioni

Possiamo quindi concludere che il confronto tra i sistemi di sterilizzazione sul confezionamento primario ha dimostrato un effetto marcato sulla stabilità del Ketoftil®.

In particolar modo è stato possibile riscontrare una diminuzione sostanziale del titolo di Ketotifene Fumarato con sterilizzazione con radiazioni gamma e beta del confezionamento primario. Inoltre si è osservato una notevole riduzione del titolo di principio attivo del farmaco anche per il confezionamento primario sterilizzato in autoclave e posto a stabilità accelerata (40°C) per 3 mesi. In questi casi infatti il titolo del principio attivo è sceso notevolmente oltre il 10%, ovvero oltre al valore ammesso per la commercializzazione del farmaco.

Per quanto riguarda il pH e l'osmolarità è stato riscontrato anche in questo caso un impatto notevole per i campioni contenuti nei confezionamenti sterilizzati con radiazioni gamma e beta e posti alla stabilità di 40°C. Per il pH in particolare tale diminuzione risulta più marcata nel caso del collirio confezionato nei flaconi sterilizzati con raggi gamma.

Per quanto riguarda l'analisi della viscosità si osserva una diminuzione dopo 3 mesi che indica una degradazione dell'agente viscosizzante TS-polisaccaride con una probabile diminuzione così del tempo di ritenzione periculare e dell'assorbimento del farmaco.

I risultati estremamente positivi riscontrati con l'ossido di etilene spingono Farmigea ad approfondire gli studi di stabilità con tale tecnica prolungandola a 6 mesi sempre nelle condizioni di stabilità di 25° e 40°C e, nell'eventualità anche questi si mantengano positivi, a proporre alla ditta produttrice del sistema Novelia® una nuova tecnica di sterilizzazione per tale packaging.

Il progetto seguirà anche nuovi sviluppi andando ad approfondire la causa del mancato riscontro di una degradazione del farmaco comparabile alla formazione delle impurezze A,B,D, verrà studiato infatti attraverso il microscopio elettronico a scansione (SEM) il quantitativo di principio attivo adsorbito dalle plastiche del confezionamento primario.



## Bibliografia

Berejka A.j., Kaluska I.M. (2008). Material used in medical devices, in International Atomic Energy Agency [Ed.], *Trends in Radiation Sterilization of Health Care Products*, IAEA, Vienna, pp. 159-174.

Bryant R., Parihar R., Rowe T., Caballa S. (2010). Stable ophthalmical composition comprising ketotifen and naphazoline and methods of making same. *brevetto europeo n. EP 2150234 A1*.

Bux A.V., Scalinci S.Z, Scorolli L., Morara M.C., Meduri R. (2003). Comparison between two artificial tear substitutes in contact lenses wearing. *ATOAggionamenti di Terapia Oftalmica* 55(1):4-9.

Carione N., Pompei R. (a cura di), *Microbiologia Farmaceutica*, Edises, Napoli, 2010, 700 pp.

Di Colo G., Zambito Y., Zaino C. and Sansò M.(2009). Selected Polysaccharides at Comparison for their Mucoadhesiveness and Effect on Precorneal Residence of Different Drugs in the Rabbit Model. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35(8):941-949.

Jewell R., Ketotifen(2007). Ketotifene. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Referenc*,1-5.

Kidd M., McKenzie S.H., Steven I., Cooper C., Lanz R., and the Australian Ketotifen Study Group (2003). Efficacy and safety of ketotifen eye drops in the treatment of seasonal allergic conjunctivitis. *Br J Ophthalmol*; 87:1206–1211.

Mehta K., (2008), Gamma irradiators for radation sterilization, in International Atomic Energy Agency [Ed.], *Trends in Radiation Sterilization of Health Care Products*, IAEA, Vienna, pp. 5-25.

Norma UNI EN 556-1:2002. pp.1-4.

Teping C., Wiedemann B.(1994). The COMOD® system. A preservative-free multidose container for eyedrops. *Klin Monbl Augenheilkd*; 205(4):210-217.

## SITOGRAFIA

ICH guidelines, disponibile a: <http://www.ich.org/products/guidelines.html> [ultimo accesso 16marzo2015]

Confezionamento Abak system disponibile a: <http://www.spectrum-thea.co.uk/hyabak/abak.aspx> [ultimo accesso 2aprile2015]

**Figure**



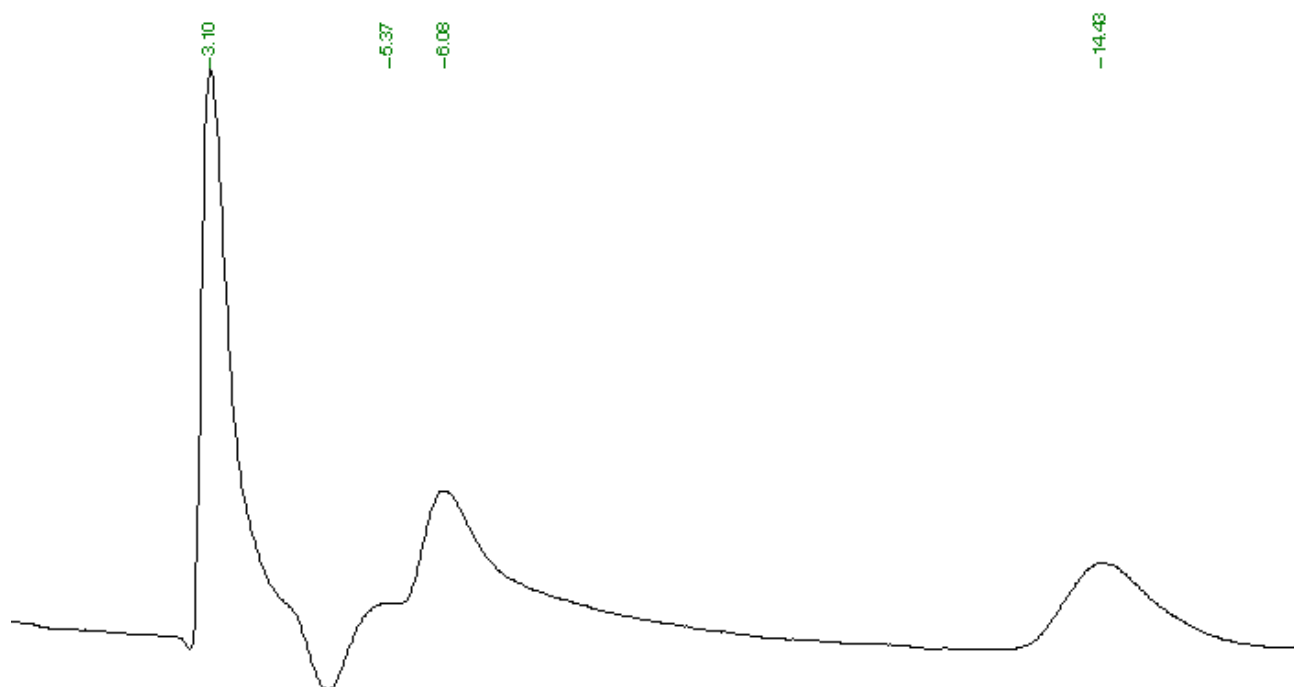


Fig. 1 Cromatogramma di Ketotifene fumarato (TR 6.08) in presenza della impurezza A (TR 14.43).

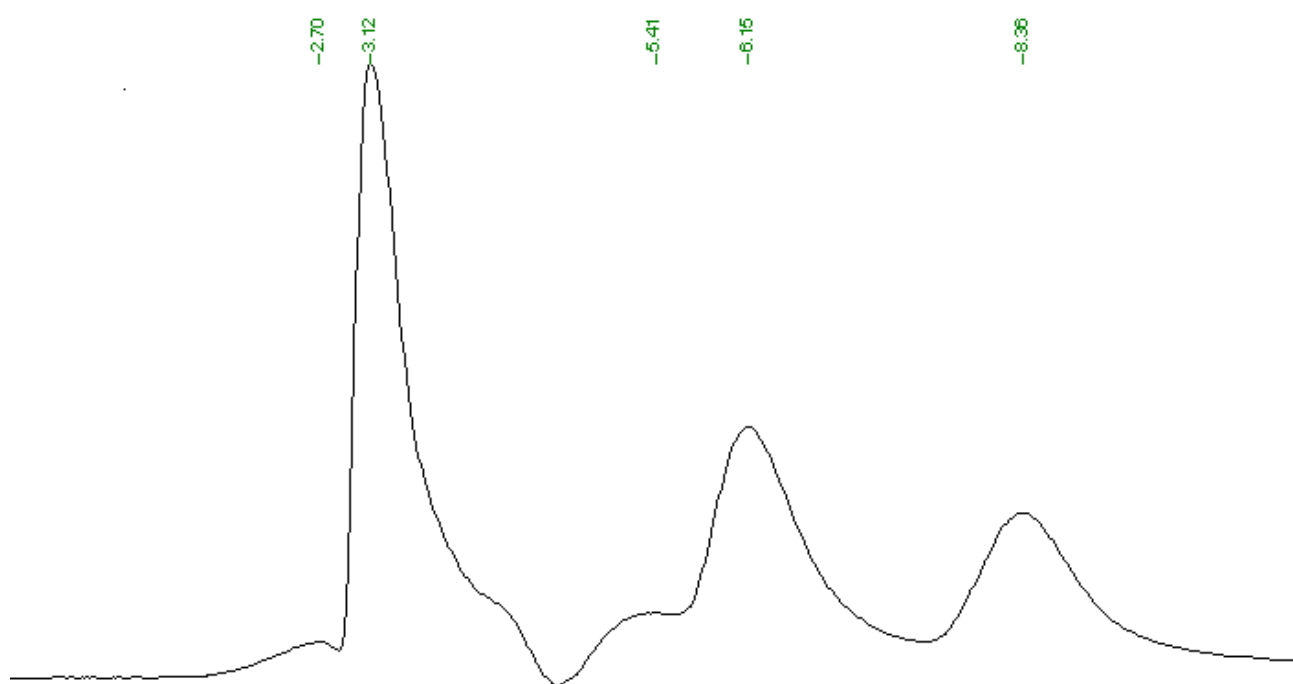


Fig. 2 Cromatogramma di Ketotifene fumarato (TR 6.15) in presenza della impurezza B (TR 8.36).

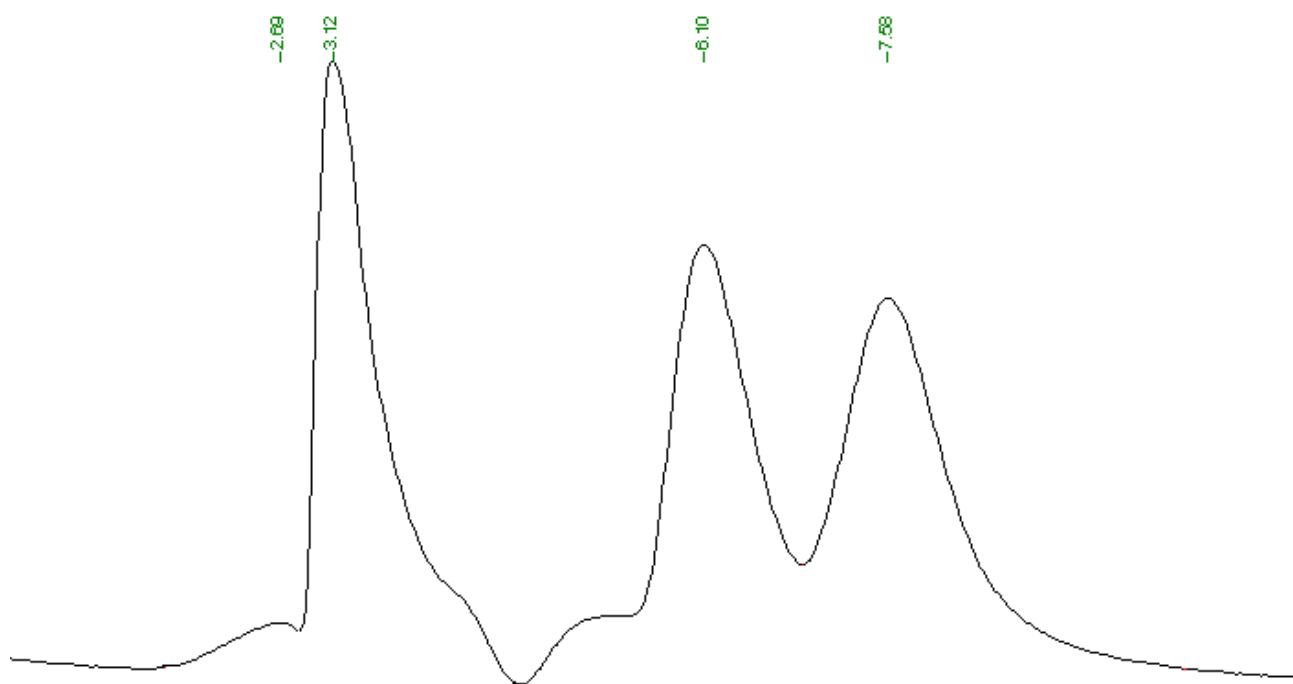


Fig. 3 Cromatogramma di Ketotifene fumarato (TR 6.10) in presenza della impurezza D (TR 7.58).

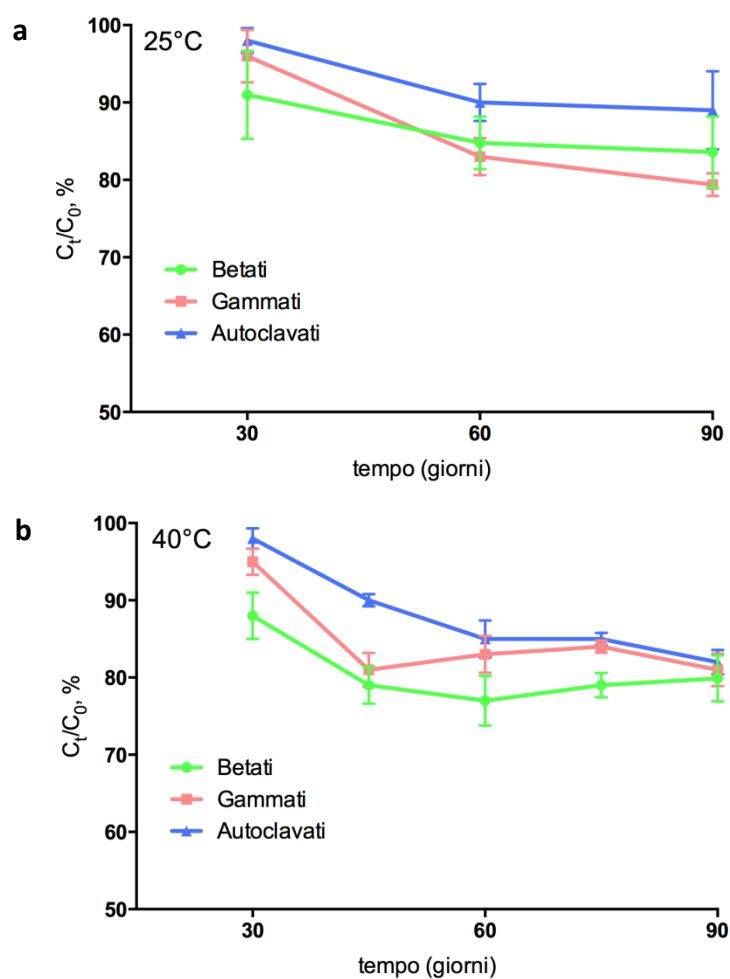


Fig 4. Misure del rapporto tra la concentrazione di Ketotifene fumarato al tempo  $t$  ( $C_t$ ) e al tempo 0 ( $C_0$ ) di campioni di Ketoftil® in flaconi multidose sterilizzati con varie tecniche di sterilizzazione e mantenuti a 25°C (Fig. 4a) oppure a 40°C (Fig. ab).

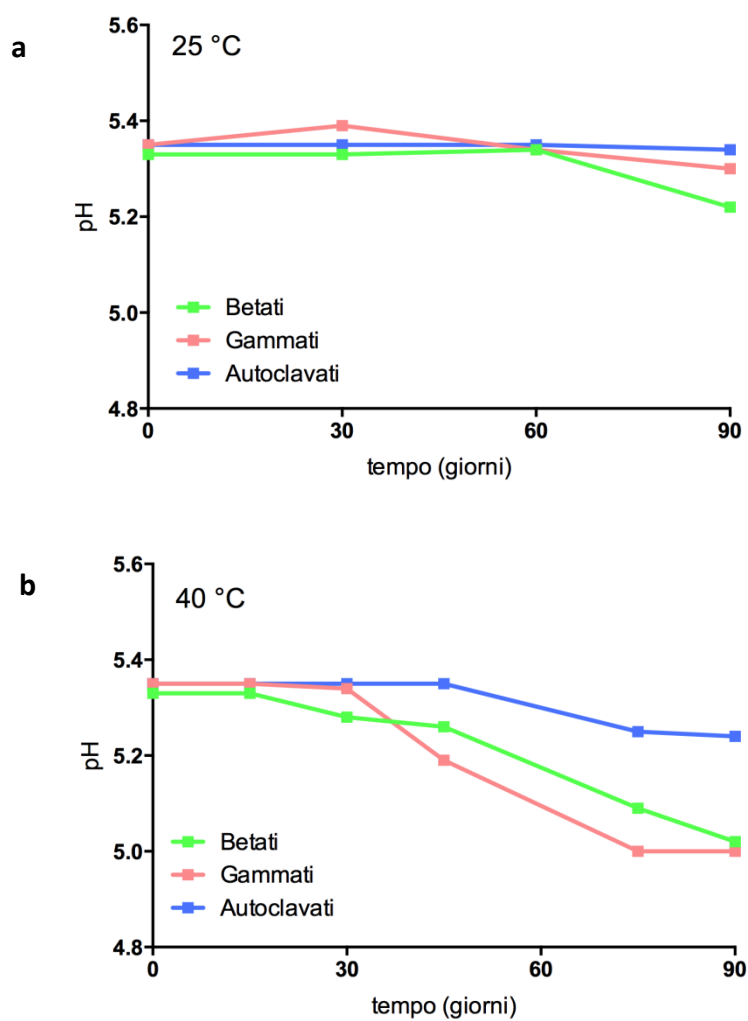


Fig 5. Misure di pH di campioni di Ketofit® in flaconi multidose sterilizzati con varie tecniche di sterilizzazione e mantenuti a 25°C (Fig. 5a) oppure a 40°C (Fig. 5b).

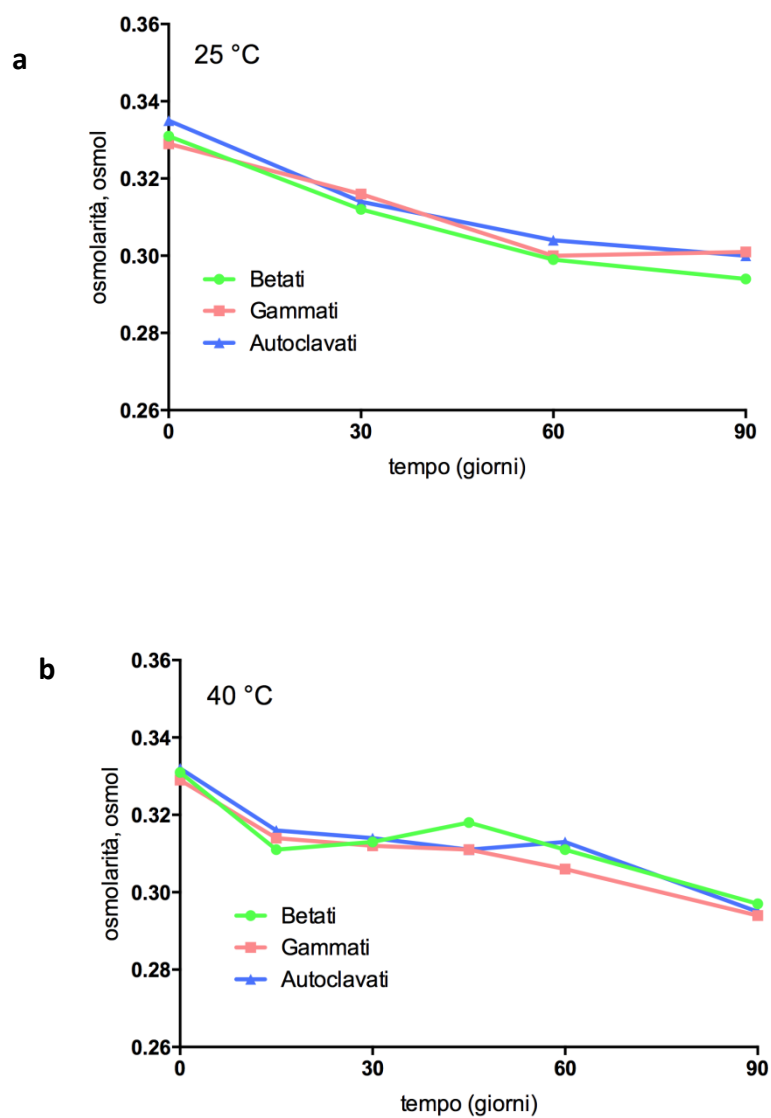


Fig 6. Misure di osmolarità di campioni di Ketoftil® in flaconi multidose sterilizzati con varie tecniche di sterilizzazione e mantenuti a 25°C (Fig. 6a) oppure a 40°C (Fig. 6b).

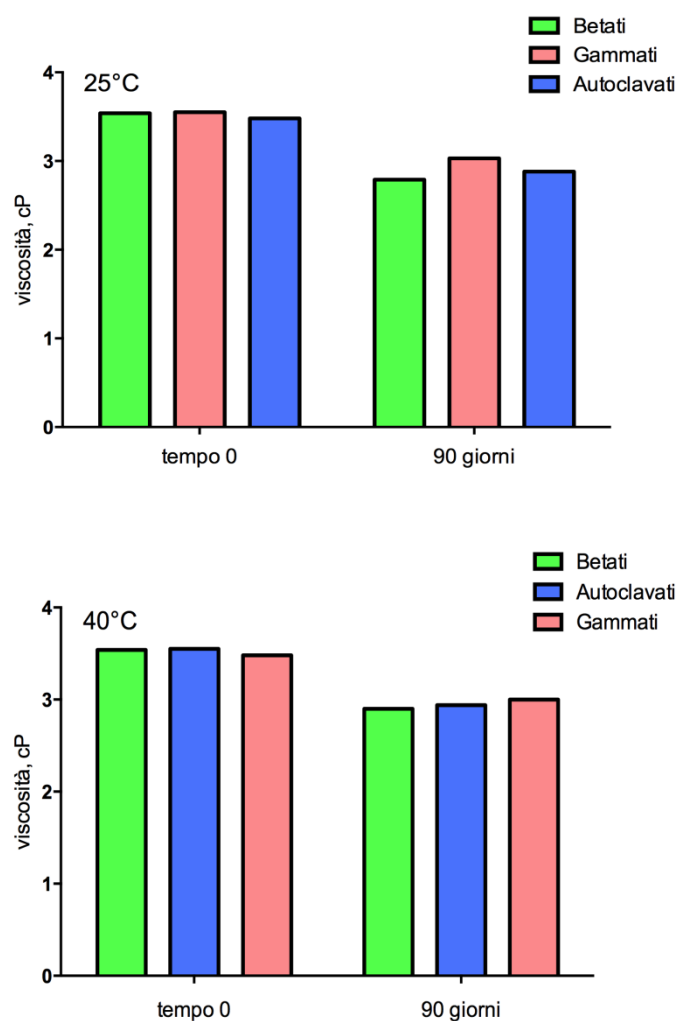


Fig 7. Misure di viscosità (100 rpm corrispondente alla velocità di taglio di  $132 \text{ sec}^{-1}$ ) di campioni di Ketoftil® in flaconi multidose sterilizzati con varie tecniche di sterilizzazione e mantenuti a 25°C (Fig. 6a) oppure a 40°C (Fig. 6b)